

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



Bakalářská práce

## **Rozdíly v acetylaci histonů v normoxii a hypoxii**

*Differences in histone acetylation in normoxia and hypoxia*

**Pavel Čepěk**

**Školitelka: RNDr. Jitka Poljaková, Ph. D.**

**Praha 2010**

**Prohlášení:**

**Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.**

**V Praze dne ..... 2010**

-----  
**Pavel Čepek**

### **Poděkování:**

**Chtěl bych touto cestou poděkovat především vedoucí práce RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za pomoc, trpělivost a cenné rady, které mi poskytovala během vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu pracovníků laboratoře kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy - Motole. Poděkování patří také mým rodičům, kteří mne během studií podporovali.**

## **Abstrakt**

Histony a jejich N a C konce podléhají kovalentním modifikacím, které regulují transkripci genů. Mezi histonové modifikace patří methylace, ubikvitinylace, SUMOylace, ADP-ribosylace, fosforylace, prolinová izomerace, deiminace a acetylace.

Acetylace histonů je regulována histonacetyltransferasami (HATs) a histondeacetylasy (HDACs). Rovnováha mezi acetylací/deacetylací histonů ovlivňuje kompaktnost chromatinu a podílí se na regulaci genové exprese. U řady lidských nádorů je acetylační rovnováha porušena a může přispívat k rozvoji maligních onemocnění. Inhibitory histondeacetylasy (HDACi) umožňují tuto porušenou acetylační rovnováhu vyrovnávat. Jeden z těchto inhibitorů je kyselina valproová (VPA), již používaná k léčbě epilepsie. V několika studiích bylo prokázáno, že VPA vykazuje protinádorové účinky. U nádorových neuroblastomových linií byla zaznamenána např. snížená exprese n-myc onkoproteinu, inhibice buněčného růstu či angiogeneze. Ačkoliv je přesný mechanismus účinku VPA na nádorové buněčné linie stále nejasný, za jeden z důležitých protinádorových účinků je považována hyperacetylace histonů H3 a H4.

V této práci je ukázáno, že kyselina valproová zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4 v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a SK-N-AS. Nejvyšší acetylace histonu H3 byla v hypoxii detekována po 12-18 hodinové inkubaci s VPA. U histonů H4 byla v hypoxii nejvyšší acetylace detekována již po 6-12 hodinové inkubaci s VPA. V normoxii dosáhla acetylace H3 a H4 maxima po 18 hodinách.

(In Czech)

**Klíčová slova:** modifikace histonů, acetylace, histondeacetylasy, valproát, neuroblastom, hypoxie.

## **Abstract**

Histones and their N and C terminal tails undergo different covalent modifications that regulate gene transcription. Among these histone modifications are methylation, ubiquitination, SUMOylation, ADP-ribosylation, phosphorylation, proline isomerization, deimination and acetylation.

Histone acetylation is regulated by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). The balance between acetylation/deacetylation influences chromatin condensation and thus regulates gene transcription. Acetylation balance is disrupted in many human cancers and this fact can contribute to the development of malignant diseases. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) can restore this acetylation imbalance. One of these HDACi is valproic acid (VPA) which has been used in treatment of epilepsy for decades. VPA shows antitumour effect in many studies. Decreased expression of n-myc oncoprotein, inhibition of tumour growth and angiogenesis are one of these anticancer effects observed in neuroblastoma cell lines after treatment with VPA. Despite the fact that exact mechanism of antitumour effect of VPA remains unclear, one of the most important mechanisms is hyperacetylation of histone H3 and H4.

It is shown in this work that VPA increases acetylation of histones H3 and H4 in human neuroblastoma cell lines UKF-NB-3 and SK-N-AS under both normoxic (21% O<sub>2</sub>) and hypoxic conditions (1% O<sub>2</sub>). The highest level of histone H3 acetylation was detected after 18 hours of incubation with 2 mM VPA in hypoxia. The highest level of histone H4 acetylation was detected earlier than histone H3 (between 6-12 hours) under same conditions. Whereas maximal level of acetylation of both H3 and H4 histones was detected after 18 hours in normoxia.

**Keywords:** histone modifications, acetylation, histone deacetylase, valproate, neuroblastoma, hypoxia.

# Obsah

<b>1. Úvod a přehled literatury.....</b>	<b>9</b>
1.1. Chromatinová struktura.....	10
1.1.1. N a C konce histonů.....	11
1.2. Modifikace histonů.....	12
1.2.1. Methylace.....	13-14
1.2.2. Ubikvitinylace.....	14
1.2.3. SUMOylace.....	15
1.2.4. ADP-ribosylace.....	15
1.2.5. Fosforylace.....	16-17
1.2.6. Deiminace a prolinová izomerace.....	17
1.2.7. Acetylace.....	18
1.3. Regulace acetylace.....	18
1.3.1. Histonacetyltransferasy.....	18-19
1.3.1.1. GNAT rodina.....	19
1.3.1.2. MYST rodina.....	20
1.3.1.3 p300/CBP rodina.....	20-21
1.3.2. Histondeacetylasy.....	21
1.4. Inhibitory histondeacetylasy.....	21-23
1.4.1. Kyselina valproová.....	24
1.4.1.1. Klinické studie.....	25
1.5. Hypoxie.....	25-26
1.5.1. Hypoxický indukibilní faktor 1.....	26
1.6. Nádorová onemocnění.....	27
1.6.1. Protoonkogeny a tumor supresorové geny.....	27
1.6.2. Neuroblastom.....	28
<b>2. Cíl bakalářské práce.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Materiál a metody.....</b>	<b>30</b>
3.1. Použité chemikálie.....	30-31
3.2. Buněčné kultury.....	31
3.3. Kyselá extrakce histonů.....	31
3.3.1. Dialýza.....	32
3.3.2. Stanovení koncentrace proteinů.....	32
3.4. Elektroforetická separace proteinů.....	32
3.5. Western blot.....	33

<b>4. Výsledky.....</b>	<b>34</b>
4.1. Stanovení koncentrace proteinů.....	34-38
4.2. Acetylace histonů H3 a H4 neuroblastomových linií.....	39
4.2.1. Acetylace histonů H3 v normoxii.....	39-40
4.2.2. Acetylace histonů H4 v normoxii.....	41-42
4.2.3. Acetylace histonů H3 v hypoxii.....	42-43
4.2.4. Acetylace histonů H4 v hypoxii.....	44-45
<b>5. Diskuse.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>47</b>
<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>48-55</b>

### Seznam použitých zkratk a symbolů

ADP	Adenosindifosfát
AMK	Aminokyselina
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
AML	akutní myeloidní leukémie
APL	akutní promyeloidní leukémie
APS	ammonium persulfate (peroxodisíran amonný)
ATP	Adenosintrifosfát
ATRA	„all trans retinoic acid“
BSA	„bovine serum albumin“ (hovězí sérový albumin)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Elk 1	„Ets (E twenty-six)-like kinase 1“
ERK	extracelulárně regulovaná kinasa
Esa 1	„essential Sas 2 related acetyltransferase 1“
FBS	„fetal bovine serum“ (fetální hovězí sérum)
GCN 5	„positive general control of transcription-5“
GNAT	GCN5-příbuzné N-acetyltransferasy
HIF 1 $\alpha$	hypoxický indukibilní faktor 1 $\alpha$
HIF 1 $\beta$	hypoxický indukibilní faktor 1 $\beta$
Hda 1	histondeacetylaza A 1
HDAC, HDACs	histondeacetylaza, histondeacetylasy
HDACi	inhibitor histondeacetylasy
HMG I	„high mobility group I“
HMT, HMTs	histonmethyltransferasa, histonmethyltransferasy
HP 1	heterochromatinový protein 1
HRP	„Horseradish peroxidase“ (křenová peroxidasa)
HSF 1	„heat shock protein 1“ (transkripční faktor teplotního šoku 1)
HSP 70,90	protein teplotního šoku-70 a 90 Kda
IC <sub>50</sub>	„half maximal inhibition concentration“
IgG	imunoglobulin G
IMDM	„Iscoe's modified Dulbecco's medium“
K	aminokyselina lysin
MDS	myelodysplastický syndrom
MOZ	„monocytic leukemia zinc finger“

MYCN	„myelocytomatosis viral related“ onkogen („neuroblastoma derived“)
MYST	MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, Tip 60
Nua3	nukleozomální acetyltransferasa histonu H3
Nua4	nukleozomální acetyltransferasa histonu H4
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
P	aminokyselina prolin
PCAF	„p300/CREB-binding protein-associated factor“
p53, p21, p17, p16	tumor supresorové proteiny 53, 21, 17, 16
CBP	„CREB (cAMP response element-binding)-binding protein“
CREB	„cAMP response element-binding“
PBS	„phosphate-buffered saline“ (fosfátový pufr se solí)
R	aminokyselina arginin
RNA	ribonukleová kyselina
S	aminokyselina serin
S fáze	syntetická fáze
SAGA	Spt/Ada/Gcn5/acetyltransferasa
Sas 2	„something about silencing 2“
Sas 3	„something about silencing 3“
SET	Suvar3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax
SDS	dodecylsulfát sodný
Sir 3	„silent information regulator 3“
SRC-1	„steroid receptor coactivator -1“
SUMO	„small ubiquitin related modifier“ (malý modifikátor příbuzný ubikvitinu)
Su(var)3-9	„suppressor of position-effect variegation“
T	aminokyselina threonin
TEMED	N,N,N',N' –tetramethylethylenediamin
TFIIE, TFIIF	general transcription factors (obecné transkripční faktory)
Tip 60	„TAT-interactive protein 60 Kda“
Tris	2-amin-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurát
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VHL	„Von Hippel-Lindau“
VPA	kyselina valproová
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)



## 1. Úvod a přehled literatury

Eukaryotické chromozomy jsou vysoce organizované struktury. Chromozom je tvořen chromatinem, který se skládá z DNA, histonů a velkého množství různých proteinových komplexů. Proteinové komplexy asistují při dynamických změnách během replikace DNA, opravy DNA, histonových modifikací a dalších procesech. Jednou z histonových modifikací regulující transkripci je acetylace uskutečňující se na N koncích jaderných histonů.

Acetylace je reverzibilní proces zprostředkovaný dvěma třídami enzymů histonacetyltransferasami (HATs) a histondeacetyltrasami (HDACs). Analýza provedená na velkých chromozomálních doménách naznačuje, že acetylační stav po celé šíři genomu podléhá neustálým změnám [1]. V savčích buňkách je jedna část jaderných histonů charakterizována rychle nastupující hyperacetylací ( $t_{1/2} = 7$  minut pro monoacetylovaný histon H4) a deacetylací ( $t_{1/2} = 3-7$  minut) [2]. U většiny typů buněk podléhá zvýšené acetylaci 10-20 % chromatinu. Druhá část jaderných histonů podléhá pomalejším změnám v acetylaci ( $t_{1/2} = 200-300$  minut pro monoacetylovaný histon H4) a deacetylaci ( $t_{1/2} = 30$  minut) [2]. Této tzv. „globální acetylaci“ se účastní větší část chromatinu. Zatímco acetylace je spojena s rozvolněním chromatinové struktury a usnadněním přístupu transkripčních faktorů a ribonukleové polymerasy, naopak deacetylace je spojena s vyšší kondenzací chromatinu a represí transkripce [3].

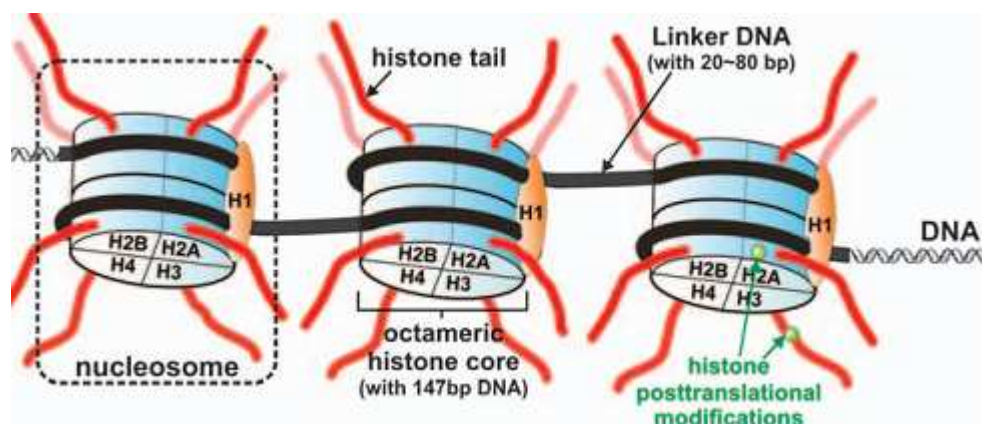
V nádorových buňkách indikuje nedostatek kyslíku (hypoxie) odlišnou expresi některých proteinů. Ta je způsobena zvýšenou či sníženou acetylací histonů. Nádorové buňky se tak v hypoxii pomocí acetylace histonů vyrovnávají se značně stresujícím hypoxickým prostředím. Simulace hypoxických podmínek může pomoci při zkoumání procesů probíhajících uvnitř nádorů.

### 1.1. Chromatinová struktura

Jaderná deoxyribonukleová kyselina (DNA) se nachází v eukaryotické buňce jako součást chromatinové struktury. V buněčném jádře musí být eukaryotická DNA dostatečně kompaktní, ale zároveň musí být transkripčně dostupná pro přístup transkripčních faktorů a přístup RNA polymerasy. U vyšších eukaryot rozlišujeme v jádře dva základní morfologické stavy chromatinu – heterochromatin a euchromatin. Heterochromatin je více kompaktní a obecně transkripčně inaktivní zatímco euchromatin je méně kompaktní a transkripčně více aktivní [3].

Základní podjednotkou chromatinu je nukleozom skládající se z oktamerového histonového jádra a DNA (**obrázek č. 1, str. 11**). Zatímco při vysoké hodnotě iontové síly může histonové jádro existovat jako ucelená jednotka bez přítomnosti DNA, při fyziologické hodnotě iontové síly histonové jádro disociuje ve  $(H3-H4)_2$  tetramer a dva  $H2A-H2B$  dimery [4]. Dimery  $H2A-H2B$  jsou umístěny na obou stranách tetrameru a spoluvytváří tak levotočivý superhelikální závit, kolem kterého je DNA obtočena [5]. Kolem histonového oktamerového jádra je tak v 1,65 otáčkách levotočivě ovinuto 147 párů bází superhelixové DNA a celková délka DNA je tak v jádře zkrácena přibližně o 1/3 [6]. Na vazbě mezi DNA a histony se podílí zejména elektrostatická interakce mezi záporně nabitou „cukr-fosfátovou“ kostrou DNA a kladně nabitými aminokyselinami histonů argininem (R) a lysinem (K). Velice zajímavá je statisticky zjištěná preference vazby malého žlábků DNA na histonový oktamer. Ta naznačuje, že na rotační orientaci DNA vázající se na nukleozom, se přednostně podílí sekvence DNA bohatá na adenin a thymin [7].

Pomocí DNA, která je obvykle tvořena 20-80 bázemi, jsou nukleozomy dále spojeny a vytvářejí kondenzovanější chromatinovou strukturu 30 nm vlákna, které vzniká nasednutím nukleozomů na sebe. Na stabilizaci 30 nm vlákna se podílí histon H1. Zatímco jaderné histony jsou nezbytné pro chromatinové složení, histon H1 pro jeho složení nezbytný není. [8]. Za fyziologických podmínek je vazba H1 na chromatin daleko méně stabilní než vazba jaderných histonů na chromatin [5]. Odstranění histonu H1 tedy představuje relativně snadnou cestu pro destabilizaci lokálního i vyššího řádu chromatinové struktury a pozměnění interakce mezi DNA a jadernými histony [5].



**Obrázek číslo 1. Struktura chromatinu.**

Chromatin je tvořen opakujícími se jednotkami nukleozomů skládajících se ze 147 párů bazí DNA obtočených kolem oktamerového histonového jádra. Histonové jádro je sestaveno ze 2 kopií histonů H2A, H2B, H3, H4. Jednotlivé nukleozomy jsou spojeny DNA tvořenou 20-80 bázemi. K nukleozomu může být připojen histon H1, podílející se na stabilizaci vyššího řádu chromatinu (tzv. „high order chromatin“). Z nukleozomu vystupují N a C konce jaderných histonů, které podléhají histonovým modifikacím. Převzato z [9].

### 1.1.1. N a C konce histonů

Všechny čtyři jaderné histony obsahují stejný strukturní motiv označovaný jako „histone fold“ skládající se z hlavního helixu, který je na obou stranách lemován smyčkou a krátkým helixem [4]. „Histone fold“ jaderných histonů je zakončen N a C konci, které podléhají kovalentním modifikacím. Čtyři H3 a H2B konce vystupují skrze úzký kanál, vytvořený malými žlábkami DNA a 3 ze 4 konců H4 a H2A vystupují buďto „vrchem“ a nebo „spodem“ nukleozomu [10]. N konce histonů se nepodílí na strukturální stabilitě nukleozomu, ale jsou nezbytné pro kondenzaci chromatinu [5]. Potvrzuje to krystalová struktura nukleozomu, kdy N konec histonu H4 interaguje s dimerem H2A-H2B sousedního nukleozomu a přispívá tak ke stabilizaci chromatinu [6]. Na stabilizaci se podílí i konce histonů H1. N a C konce histonu H1 interagují s DNA uvnitř nukleozomu a s DNA spojující jádra nukleozomů. Převládající množství bazických residuí nacházejících se na koncích histonu H1, tak neutralizuje polyfosfátovou kostru DNA a usnadňuje složení nukleozomů do struktury vyššího řádu [11].

Délka a aminokyselinové složení N konců histonů se liší v závislosti na typu histonu od 16 do 44 aminokyselin (H3 tvořen 44 AMK, H4 26 AMK, H2B 32 AMK, H2A 16 AMK) [2].

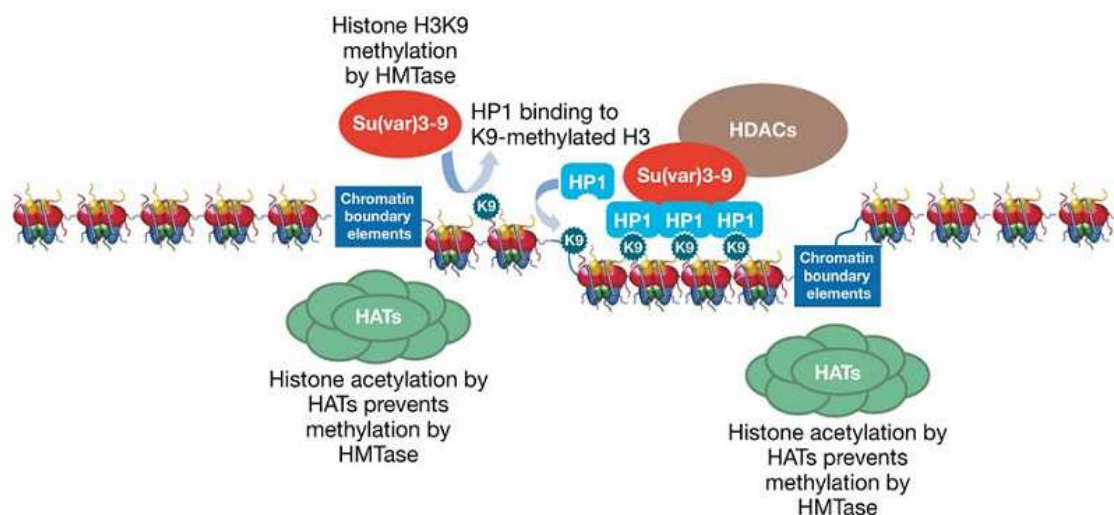


### 1.2.1. Methylation

Methylation on N termini of histones can occur at three levels for lysine (mono, di, or trimethylation) and at two levels for arginine (mono and dimethylation) [18]. Although histone demethylases (e.g., LSD 1-lysine demethylase 1) that remove mono or dimethyl groups from N termini of histones, enzymes responsible for removal of trimethyl groups have not yet been identified [18]. Therefore, methylation (especially trimethylation) is considered a much more stable modification than others. Enzymes responsible for methylation of N termini of histones have been divided into several groups.

- a) Specific lysine histone methyltransferases (HMTs) containing SET (Suvar 3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) domain, which methylates lysine residues of histone H3 at positions 4/9/27/36 and lysine residues of histone H4 at position 20.
- b) Lysine HMTs not containing SET domain methylate lysine at position 79 of histone H3. The only one identified so far is histone methyltransferase (HMT) Dot 1 („disruptor of telomeric silencing 1“) [18].
- c) Arginine methyltransferases methylate arginine (R) residues of histones H3 and H4 at positions H3R2/17/26 and H4R3 [18].

Methylation of lysine residues is related to transcriptional activation (H3K4, H3K36, H3K79) or repression (H3K9, H3K27, H4K20) [13]. Very well described process is methylation of H3K9 and subsequent binding of HP 1, which is related to gene repression and inactivation of chromosome X [19]. Inactivation is preceded by deacetylation of lysine H3K9 and subsequent methylation with participation of HMT Su(var) 3-9 („suppressor of position-effect variegation“) and binding of HP 1 (**obrázek č. 3, str. 14**) [19].



**Obrázek číslo 3. Model postupného skládání heterochromatinu.**

Deacetylase histonu (H3K9) pomocí komplexu histondeacetylasy (HDACs) umožňuje metylaci H3K9 pomocí HMT Su(var) 3-9. Na methylovaný lysin se poté pomocí chromodomény váže HP 1 a řídí skládání heterochromatinu. Postup HP 1 po heterochromatinu může být zastaven „chromatinovými vazebnými elementy“, což jsou potencionální místa pro navázání HATs, která brání metylaci H3K9 pomocí Su(var) 3-9. Převzato z [18].

Kromě dosud popsané methylace na „genové úrovni“ dochází k metylaci i na úrovni „chromozomální“. Na chromozomální úrovni hrají důležitou roli CpG (cytosin-fosfát-guanin) ostrůvky, které se nachází v promotorové části genu [20]. Promotor je sekvence DNA, na kterou se váží transkripční faktory nebo RNA polymerasa a spouští se transkripce genu. Hypermethylace těchto úseků je spojována se zastavením transkripce a inaktivací některých tumor supresorů zahrnujících p15, p16, p53 a nebo ubikvitin ligasy VHL („Von Hippel - Lindau“) [20]. Jednou z příčin hypermethylace je zvýšená exprese HMTs.

### 1.2.2. Ubikvitinylace

Ubikvitinylací podléhají C konce jaderných histonů H2A a H2B, respektive jejich lysinové zbytky. Na C konci ubikvitinu, proteinu skládajícího se z 76 aminokyselin, je karboxylová skupina zodpovědná za vazbu na lysinová residua (H2AK119/120, H2BK123) [21]. Ubikvitin je připojen k substrátu pomocí 3 ubikvitinylačních enzymů E1, E2, E3. Ubikvitin musí být nejdříve aktivován za spotřeby ATP pomocí aktivačního enzymu E1, dále je ubikvitin předán na cystein konjugačního enzymu E2 a v posledním kroku je

ubikvitin přenesen na lysin cílového substrátu pomocí ligačního enzymu E3. Ubikvitinylace C konců histonů je spojována jak s represí tak i transkripční aktivací. Ubikvitinylace H2BK120 zprostředkována komplexem RNF20/RNF40 („ring finger protein 20/ring finger protein 40“) a UbcH6 (ubikvitinylační konjugací enzym 6) je například spojena s transkripční aktivací HOX („homeobox“) genu [13, 22]. U pučících kvasinek byly identifikovány dva enzymy (Ubp 8 a Ubp10) deubikvitinylující H2BK123. Odstranění ubikvitinu za pomoci Ubp 8 („ubiquitin-specific processing protease 8“), která je součástí acetyltransferasového komplexu SAGA (Spt/Ada/Gcn5/acetyltransferasa), je nutné pro aktivaci transkripce. Naopak Ubp 10 je na heterochromozomálních koncích spojována s potlačením transkripce [13, 22].

Kromě C konců histonů jsou ubikvitinylovány i ostatní proteiny. Pomocí polyubikvitinového řetězce jsou proteiny označeny a následně degradovány v proteazomu. Čím delší ubikvitinový řetězec, tím výraznější je degradace ubikvitinylovaného proteinu. Ubikvitin ligasa VHL tak například kontroluje funkci tumor supresorového proteinu p53 a nebo proteinu HIF 1 $\alpha$  (hypoxický indukibilní faktor 1 $\alpha$ ), který se podílí na růstu nádorů a vaskularizaci [21].

### 1.2.3. SUMOylace

SUMO (malý modifikátor příbuzný ubikvitinu) je molekula příbuzná ubikvitinu s podobnou 3D strukturou [23]. Ačkoliv jsou si velice podobné i co se do velikosti týče (SUMO 9 Kda, ubikvitin 11 Kda), SUMO se nepodílí na degradaci proteinů. SUMO se u savců vyskytuje ve třech formách (SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3) a je kovalentně připojený k proteinům skrze aktivační kaskádu E1-E2-E3 podobně jako při ubikvitinylaci [24]. SUMOylace je povětšinou spojena s transkripční represí, což dokumentuje i Shiova a Eisenmanova práce [25]. Ta ukazuje, že H4 SUMOylace je doprovázena zvýšenou acetylací H4 [25]. Dále je také v této práci prokázáno, že H4 SUMOylace v chromatinu zvyšuje deacetylaci a vazbu HP 1 [25]. Ačkoliv je známo, že SUMOylaci podléhají lysinová residua histonů, dosud nebyla zmapována konkrétní vazebná místa [23].

SUMOylace se podílí i na regulaci nehistonových proteinů stimulací aktivit proteinů HSF 1 (transkripční faktor teplotní šoku 1) nebo p53 [23]. Povětšinou je ovšem SUMOylace spojována se sníženou transkripční aktivitou Elk 1, c-myc, c-jun [23]. SUMOylace dokáže podporovat či inhibovat interakci mezi transkripčním faktorem a korepresorovým nebo koaktivátorovým komplexem, což v důsledku vede k represí či aktivaci genové transkripce [26].

Příklad represe u savců poskytuje SUMOylace Elk 1 [“Ets (E twenty-six)-like kinase 1“], která je součástí signalizační kaskády MAPK (mitogenem aktivovaná proteinová kinasa). V základním stavu je Elk-1 modifikována pomocí SUMO, což vede k navázání HDAC 2 na Elk 1 a k represi cílových genů [26]. Je-li kaskáda aktivována pomocí ERK (extracelulárně regulovaná kinasa), Elk 1 je fosfororylována a současně s tím ztrácí SUMO a HDAC 2, což vede k aktivaci cílových genů [26]. SUMO pravděpodobně dokáže regulovat i aktivitu HATs (p300/CBP), HDACs, HMTs. Možný regulační mechanismus byl pozorován u p300/CBP, na který se za přispění SUMO váže HDAC 6, která způsobuje transkripční represi [26].

#### **1.2.4. ADP-ribosylace**

ADP-ribosylace se vyskytuje ve dvou formách, mono-ADP-ribosylaci a poly-ADP-ribosylaci. Mono-ADP-ribosylace je spojována s reparačním mechanismem DNA a buněčnou proliferací [27]. Vystavení buněk OH radikálům, alkylačním nebo arylačním činidlům je provázeno zvýšenou mono-ADP-ribosylací histonů. Zejména u histonu H1, kde byla pozorována zvýšená hladina mono-ADP-ribosylačních skupin dokonce 30krát [28]. Mono-ADP-ribosylace H4, přednostně se vyskytující s hyperacetylovaným H4, tak naznačuje možnou „komunikaci“ mezi těmito dvěma modifikacemi [28].

Mono-ADP-ribosylace se spolu s jinými modifikacemi podílí na buněčné odpovědi při vzniklém poškození DNA. Spolu s jinými modifikacemi pravděpodobně způsobuje navázání dodatečných signalizačních faktorů a proteinů, podílejících se na modifikaci chromatinu [27]. To může vést k informaci o typu poškození DNA a k navázání vhodného reparačního aparátu. Jelikož se stupněm poškození DNA souvisí i buněčná proliferace a apoptóza (buněčná programovaná smrt), může se podílet mono-ADP-ribosylace i na regulaci těchto buněčných procesů [27].

Účast poly-ADP-ribosylace na histonovém kódu nebyla dlouho potvrzena. Až v roce 2010 byla publikována práce dokazující poly-ADP-ribosylaci jaderných histonů. Bylo zjištěno, že PARP 1 (poly-ADP-ribosylační polymerasa 1) modifikuje všechny čtyři N konce jaderných histonů na lysinových residuích – H2AK13, H2BK30, H3K27/37, H4K16 [29].



### 1.2.5. Fosforylace

O fosforylaci histonů a genové expresi doposud není mnoho známo. Fosforylace je spojována s rozvolněním chromatinové struktury prostřednictvím záporného náboje fosfátové skupiny a s usnadněním přístupu transkripčního aparátu. Fosforylace je uskutečňována na serinových (S) a threoninových (T) zbytcích jaderných histonů pomocí fosfatasy a kinas. Fosforylace se podílí na kondenzaci chromozomu, aktivaci či represi transkripce a opravě poškozené DNA [30]. Nejčastěji můžeme fosforylaci nalézt na N konci histonu H3 (T3/11 a S10/28) a to zejména během mitózy [32]. V savcích buňkách začíná zvýšená fosforylace serinu na pozici 10 a 28 histonu H3 ke konci G2 fáze buněčného cyklu v pericentromerických oblastech a jak mitóza postupuje, tak se šíří skrze celá chromozomální raménka [31]. Zvýšená fosforylace serinu na pozici 10 histonu H3 (H3S10) a threoninu na pozici 28 histonu H3 (H3T28) úzce souvisí s acetylací lysinu na pozici 9 a 14 histonu H3 (H3K9, H3K14) a je spojována s transkripční aktivací protoonkogenů c-jun, c-fos [31]. Za fosforylaci je zodpovědná třída kinas zvaná Aurora B [30]. Možný synergizmus mezi acetylací a fosforylací byl pozorován i u fosforylace H3T11 umožňující následnou vazbu HAT p300/CBP a acetylaci H3K9 a H3K14 [32]. Nedávno zjištěná fosforylace, kterou zprostředkovává kinasa haspin („haploid germ cell specific nuclear protein kinas“) byla zjištěna u threoninu na pozici 3 histonu H3. Tato modifikace je mezi druhy vysoce zachovalá a pravděpodobně plní v buňce nějakou zásadní funkci [31].

Fosforylace modifikuje i nehistonové proteiny. Fosforylace reguluje enzymovou aktivitu jak HDACs, tak i HATs. Aktivita HAT CBP [“CREB(cAMP response element-binding)-binding protein“] je stimulována fosforylací E cyklin-dependentní kinasy 2 [33]. Jelikož je aktivita CBP vyžadována pro regulaci buněčného cyklu – resp. pro vstup do S fáze, tvoří fosforylace významnou část této regulace. Fosforylace je také důležitou součástí aktivity a signalizace HDACs pro jejich přechod mezi jádrem a cytoplazmou.

### 1.2.6. Deiminace a prolinová izomerace

Deiminace je modifikace přeměňující arginin H3 a H4 na citrulin za pomoci enzymu PADI 4 (peptidylová argininová deiminasa 4). Studie *in vivo* dokumentuje, že přeměně podléhá pouze monomethylovaný arginin. Jelikož citrulin methylaci nepodléhá, může se tak deiminace podílet na antagonizmu aktivačního mechanismu [34]. I když nebyl doposud identifikován enzym schopný zpětné přeměny citrulinu na arginin, existence takového enzymu je předpokládána [34].

Aminokyselina prolin se vyskytuje buďto v cis a nebo trans konformaci. U pučících kvasinek byl detekován enzym FPR 4 (peptidylová prolinová izomerasa 4) zodpovědný za

izomeraci prolinu (P) na N konci histonu H3P30 a H3P38. Změna konformace prolinu deformuje polypeptidovou kostru. FPR 4 tak například izomeruje H3P38 a reguluje úroveň methylace H3K36. Vhodná konformace prolinového zbytku je tak nejspíš nezbytná pro rozpoznání a methylaci H3K36 pomocí histonmethyltransferasy Set 2 [35].

### **1.2.7. Acetylace**

Acetylace histonů je jedna z nejlépe prozkoumaných reverzibilních kovalentních modifikací. Acetyl je připojen na lysinová residua N konců histonů pomocí histonacetyltransferas (HATs) nesoucích acetyl-CoA a odstraněn pomocí histondeacetylasy (HDACs). Navázání záporně nabitého acetylu na kladně nabitě lysinové aminokyseliny oslabuje vazbu mezi DNA a histony, způsobuje rozvolnění chromatinové struktury a je tak spojeno s aktivací genů [1, 36]. Deacetylace je naopak provázena zvýšenou chromatinovou kondenzací a tedy genovou represí [1]. K acetylaci dochází na všech čtyřech N koncích jaderných histonů v těchto místech: u lysinu histonu H2A na pozici 5 a 9; u lysinu histonu H2B na pozici 5, 12, 15 a 20; u lysinu histonu H3 na pozici 9, 14, 18 a 23; u lysinu histonu H4 na pozici 5, 8, 12 a 16.

Kromě acetylace N konců byla u kvasinek detekována acetylace i v rámci jaderné domény H3K56, kde se podílí na signalizaci při dokončení opravy DNA [37].

## **1.3. Regulace acetylace**

Regulace acetylace je uskutečňována pomocí dvou typů enzymů HATs a HDACs. Zatímco HATs histony acetylují, HDACs je deacetylují. Acetylace histonů je spojena s rozvolněním chromatinové struktury a usnadněním přístupu transkripčních faktorů a ribonukleové polymerasy, naopak deacetylace je spojena s vyšší kondenzací chromatinu a represí transkripce [3].

### **1.3.1 Histonacetyltransferasy**

HATs se dají dle buněčné lokalizace rozdělit na dvě skupiny: skupinu A, nacházející se v buněčném jádře a skupinu B, nacházející se v cytoplazmě. HATs skupiny B plní v cytoplazmě funkci jakési „údržby“ histonů neboli acetyluje nově syntetizované histony, které jsou pak dále transportovány do jádra, v němž mohou být deacetylovány a začleněny do chromatinu [38]. HATs skupiny A jsou zodpovědná za acetylaci již inkorporovaných

chromatinových histonů [38]. Jelikož jsou HATs součástí různých multienzymových komplexů, nemusí proto některé z nich přesně zapadat do tohoto rozdělení [38]. Na základě sekvenční podobnosti spadají HATs do několika rodin: GNAT (GCN5-příbuzné N-acetyltransferasy), MYST (MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, Tip 60) p300/CBP, SRC-1 („steroid receptor coactivator -1“) a TAF<sub>II</sub> 250 rodiny [„TBP (TATA-binding protein)-associated factor“] [38, 39].

HATs mohou samostatně acetylovat nejméně jeden typ volného histonu. V HAT komplexu HATs acetylují i histony nukleozomální. Gcn 5 acetyluje H3K9/14/18 a navíc H2B jako součást HAT komplexu SAGA. Není-li Gcn 5 součástí HAT komplexu samostatně acetyluje H3K14 a méně pak H4K8 a H4K16 [38, 39].

HATs se váží na lysinová residua pomocí bromodomén (CBP/p300, GCN5) nebo chromodomén (Esa 1) a acetylují lysin pomocí domén s histonacetyltransferasovou aktivitou [39]. Substráty HATs jsou shrnuty do **tabulky č. 1**.

**Tabulka číslo 1. Histonové a nehistonové substráty HATs.** Převzato a upraveno z [39].

HATs a HATs komplexy	Substrát
<b>GCN5/PCAF rodina</b>	
Gcn5	H3K14, H4K8/16
PCAF	H3K14, p53 (K320), TFIIE, TFIIIF, HMG I
GCN5/Ada	H3K14/18, H2B(nukleozomální)
GCN5/SAGA	H3K9/14/18, H2B (nukleozomální)
PCAF/complex	H3, H4
<b>MYST rodina</b>	
Esa 1	H4K5/8/16, H3K14, H2AK5
MOF	H4K16, H3, H2A
Tip 60	H4, H3, H2A
Sas3	H3, H4, H2A
Esa 1/NuA4	H4, H2A (nukleozomální)
Sas3/NuA3	H3 (nukleozomální)
<b>p300/CBP</b>	H2AK5, H2BK12/15, H3K14/18, H4K5/8, p53 (K373/382)3, HMG I, TFIIIF
<b>SRC-1</b>	H3K9/K14

#### 1.3.1.1. GNAT rodina

V savčích buňkách (zjišťováno u člověka a myši) je GNAT rodina zastoupena dvěma příbuznými proteiny GCN 5 a PCAF („p300/CREB-binding protein-associated factor“). Funkce lidské GCN 5 (hGCN5) byla studována *in vitro* i *in vivo*. Zatímco rekombinantní krátká forma hGCN5 (postrádá N-koncovou část) acetyluje histon H3 a méně pak histon H4 pouze jako volné histony, celá forma hGCN5 (včetně N-koncové části) je schopna acetylovat histony nukleozomální [37]. Podobnou funkci jako hGCN5 má i PCAF, který ve své rekombinantní formě acetyluje buď volné histony nebo nukleozomální – primárně H3K14 a méně pak H4K8 [38]. Mimo to byla u PCAF zjištěna i acetylace transkripčně příbuzných proteinů jako např. p53, E2F („E2 promoter binding factor“), TFIIE, TFIIIF, HMG I („high mobility group I“) [37,38]. Ve většině případů vede acetylace transkripčně příbuzných proteinů ke zvýšení jejich vazebné afinity na DNA [38, 39]. Vyjimku tvoří protein HMG I, u kterého byla naopak zjištěna snížená vazebná afinita [38].

#### 1.3.1.2. MYST rodina

U pučících kvasinek se MYST rodina skládá z Esa 1 („essential SAS2 related acetyltransferase 1“), Sas 2 („something about silencing 2“), Sas 3 („something about silencing 3“). Zatímco samostatně jsou schopny Esa 1, Sas 2 a Sas 3 acetylovat 6 lysinových zbytků volných histonů (H2AK5, H3K14, H4 K5/8/12/16), v multienzymovém komplexu acetylují histony nukleozomální. Esa 1 je jednotkou komplexu Nua4 (nukleozomální acetyltransferasa histonu H4) acetylující histon H4 a Sas 3 je katalytickou jednotkou Nua3 (nukleozomální acetyltransferasa histonu H4) acetylující histon H3 [38, 39].

Součástí MYST rodiny je i MOZ („monocytic leukemia zinc finger“) protein, který je spojován s transformací onkogenu vedoucí k leukemii. U akutní myeloidní leukemie (AML) vede chromozomální translokace k fúzi mezi dvěma proteiny MOZ a CBP [40]. Fúzní protein MOZ-CBP pak vykazuje odlišnou histonacetyltransferasovou aktivitu vedoucí k rozvoji leukemie [40]. Fúze MOZ byla u leukemie zjištěna i s dalším transkripčně příbuzným proteinem TIF 2 („transcriptional intermediary factor 2“) [41].

#### 1.3.1.3. p300/CBP rodina

Další protein vykazující histonacetyltransferasovou aktivitu je p300/CBP. Narozdíl od ostatních HATs p300/CBP acetyluje všechny čtyři jaderné histony jak volné, tak i nukleozomální [38]. Protein p300/CBP se účastní celé řady buněčných funkcí jako např.

kontroly buněčného cyklu a diferenciace [42]. Geny kódující p300/CBP jsou často translokovány, mutovány nebo příliš exprimovány a bývají často spojovány s nádorovými onemocněními jako např. nádory tlustého střeva nebo žaludku [43]. Gen kódující CBP je mutován u pacientů s Rubinstein-Taibiho syndromem, vývojovou poruchou, která je spojována s vyšším rizikem výskytu nádorových onemocnění [43]. Mimo to protein p300/CBP stimuluje transkripci specifických genů interakcí s celou řadou protonkogenů jako např. c-Fos, c-Jun [42,43].

### 1.3.2. Histondeacetylasy

HDACs snižují úroveň acetylace histonů a mohou vést k lokálním změnám v chromatinové struktuře a specifické genové represi [44]. Na základě podobnosti s kvasinkovými proteiny (Rpd3, Hda 1, Sir 3) jsou lidské HDACs rozděleny do tří tříd [45]. HDACs třídy I (HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3 a HDAC 8) se primárně vyskytují v buněčném jádře a stejně jako HDACs třídy II jsou zinkově dependentní. HDACs třídy II (HDAC 4, HDAC 5, HDAC 6, HDAC 7, HDAC 9, HDAC 10) se vyskytují především v cytoplazmě, ale v reakci na určité buněčné signály jsou schopné přecházet do jádra a zpět do cytoplazmy [46]. Zatímco třída HDACs I je exprimována ve většině typů buněk, exprese HDACs třídy II je omezena [45]. HDACs třídy III jsou velice strukturně odlišné od ostatních tříd. HDACs třídy III vyžadují pro svou funkci kofaktor  $\text{NAD}^+$ , nejsou zinkově dependentní a obecně se nedají inhibovat sloučeninami, které inhibují zinkově dependentní HDACs. Kromě výše uvedených tří HDACs tříd, vyšší eukaryota exprimují ještě další zinkově dependentní histondeacetylasy HDAC 11, která byla zařazena do oddělené třídy HDAC IV [45].

Pozměněná exprese HDACs byla zjištěna u několika lidských nádorových onemocnění. Zvýšená míra přepisu HDACs byla například zaznamenána u některých nádorů tlustého střeva (HDAC 2 a HDAC 3) nebo nádorů plic (HDAC 5 a HDAC 10) [46]. Dále pak u HDAC 1, kde její vyšší exprese vedla ke snížení exprese tumor supresorového proteinu p53 a ubikvitin ligasy VHL, ale naopak ke zvýšení exprese VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) [45]. HDAC 1 a HDAC 3 dále ovlivňují přepis genu HIF 1 $\alpha$  a ve výsledku ovlivňují novotvorbu krevních kapilár tzv. angiogenezi [46]. Podíl na vzniku leukemie byl stejně jak u HATs prokázán i u HDACs. Například onkoprotein PML-RAR $\alpha$  („promyelocytic leukemia/retinoic receptor  $\alpha$ “), který u akutní promyeloidní leukémie (APL) vzniká translokační fúzí genů, potlačuje genovou transkripci spojením s korepresorovým komplexem majícím HDAC aktivitu [47]. Podobná situace nastává i u AML, kde při chromozomální translokaci vzniká protein AML1-ETO („acute myeloid

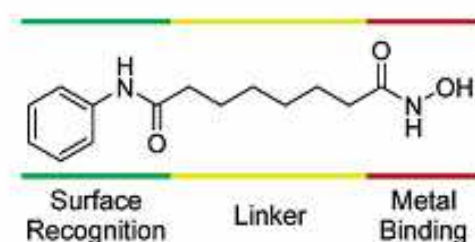
leukemia 1-eight twenty one“), který nesprávně váže HDACs k cílovým genům a vede ke specifické genové represi [46, 47].

Mezi substráty HDAC patří kromě histonů i další proteiny. Cílem HDACs jsou obecné transkripční faktory (TFIIE, TFIIIF), tumor supresorový protein p53, enzymy podílející se na opravě DNA, chaperonové proteiny (HSP 70, 90) a strukturální proteiny ( $\alpha$  tubulin, kortaktin) [44].

### 1.3. Inhibitory histondeacetylas

Sloučeniny schopné inhibice aktivity HDAC se nazývají inhibitory histondeacetylas (HDACi). HDACi se váží do aktivního místa HDACs, blokují přístup substrátu, což vede k akumulaci acetylovaných histonů. Blokáce HDACs samozřejmě vede i k neschopnosti regulovat nehistonové proteiny a přispívá tak k biologickým účinkům HDACi jako možných chemoterapeutik proti různým druhům maligních onemocnění. Mezi biologické účinky HDACi patří indukce apoptózy, zastavení buněčného cyklu (tzv. „cell cycle arrest“) či inhibice angiogeneze [48]. Účinky HDACi na angiogenezi zahrnují snížení exprese proteinů HIF 1 $\alpha$  a VEGF a zvýšení exprese proteinů p53 a VHL v různých typech maligních onemocnění.

Na základě krystalové struktury HDACi byly popsány strukturní rysy inhibitorů a shrnuty do třech základních charakteristik (**obrázek č. 4**). Inhibitor HDACs je obecně tvořen tzv. „metal binding domain“ - doménou vázající se na aktivní místo HDAC, dále pak tzv. „surface recognition domain“ - doménou zodpovědnou za rozpoznání správné cílové molekuly. Tyto dvě domény jsou pak spojeny obvykle alkylovým, arylovým či vinylovým řetězcem prostupující hydrofobním tunelem HDAC [47, 48]. Tyto strukturní rysy mimo jiné přispěly k návrhu několika HDACi.



**Obrázek číslo 4. Strukturní rysy HDACi.**

Na obrázku je zobrazena SAHA („suberoylanilide hydroxamic acid“), první schválený HDACi pro léčbu pokročilých kožních T lymfomů. HDACi je složen ze tří charakteristických částí. Zeleně označená je doména zodpovědná za rozpoznání cílové molekuly, doména označená červeně je zodpovědná za inhibici katalytického místa HDAC, žlutě označená je část molekuly spojující obě domény. Převzato z [47].

Mezi HDACi patří celé řady látek jako např. elektrofilní ketony, benzamidy, cyklické peptidy, alifatické kyseliny, hydroxamáty a další. Mnoho HDACi je v různém stupni klinického testování nebo je již používáno v léčení maligních onemocnění [48, 49].

Prvním FDA (Úřad pro schvalování potravin a léčiv) schváleným HDACi pro léčbu pokročilých kožních T lymfomů byla SAHA („suberoylanilide hydroxamic acid“) neboli Vorinostat (uveden na trh pod názvem Zolinza). Dalším HDACi je Panobinostat, který je v I. a II. fázi klinického vývoje pro léčbu hematologických a solidních nádorů [49]. Několik dalších HDACi je v současné době v různých fázích testování u pacientů s rozličnými typy hematologických a solidních nádorů zahrnujících lymfatickou leukemii, Hodgkinův lymfom, lymfom B buněk, AML, nádory krku, hlavy, mozku, plic, vaječníku a prsu [49, 50]. Nejčastějšími vedlejšími účinky při léčbě HDACi jsou únava, nevolnost, dehydratace a průjem [50]. Obecně jsou tyto účinky reverzibilní a po ukončení podávání léku odezní [49]. Současný přehled HDACi samostatně používaných k léčbě nádorových onemocnění je shrnut do **tabulky č. 2**.

**Tabulka číslo 2.** Různé fáze klinického testování HDACi samostatně používaných k léčbě maligních onemocnění. Převzato z [49].

HDACi	Fáze	Typ nádoru (počet pacientů)
<b>Hydroxamáty</b>		
Vorinostat	II	Solidní tumory (16), nádory krku a hlavy (13),
Belinostat	I	Pokročilé solidní tumory (46)
<b>Cyklické peptidy</b>		
Romidepsin	II, I	Neuroendokrinní nádory (15), nádory plic (28), <i>solidní nádory</i> (24)
<b>Alifatické kyseliny</b>		
Fenylbutyrát sodný	I	Solidní tumory (24), gliomy (23)
Kyselina valproová	I	Solidní tumory (26)
<b>Benzamidy</b>		
Entinostat	I	Solidní tumory nebo lymfomy (27)

HDACi také vykazují velmi dobré protinádorové účinky v kombinaci s ostatními chemoterapeutiky (**tabulka č. 3**). Pozitivní účinek HDACi byl ukázán v klinických studiích u pacientů se solidními nádory v kombinaci s inhibitory topoizomerasy II (epirubicin), inhibitory methylace DNA (azacytidin) či s cytostatiky (karboplatina, paklitaxel) [49-51].

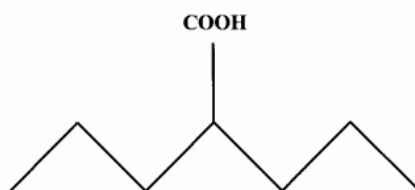
**Tabulka číslo 3.** Částečný přehled klinických studií HDACi používaných při léčbě nádorových onemocnění v kombinaci s ostatními agents. Převzato z [49].

HDACi	Kombinace s jiným léčivem	Fáze	Typ nádoru (počet pacientů)
Kyselina valproová	Epirubicin	I	solidní tumor (48)
Valproát hořečnatý	Hydrazalin	II	solidní tumor (17)
Kyselina valproová	Azacytidin	I	solidní tumor (55)
Vorinostat	Karboplatina, paklitaxel	I	solidní tumor (28)
Fenylbutyrát	Fluorouracil	I	kolorektální tumor (9)
Tacedinalin	Kapicitabin	I	solidní tumor (54)
Tacedinalin	Gemcitabin	II	tumor slinivky břišní (86)

#### 1.4.1. Kyselina valproová

Kyselina valproová neboli valproát (VPA) je osmiuhlíkatá sloučenina s karboxylovou skupinou, která je navázána na 4. uhlíku (**obrázek č. 5, str. 25**). Její název dle UPAC je kyselina 2-propylpentanová. Kyselina valproová byla objevena v roce 1882, ale až v roce 1962 se dostala do středu zájmu v souvislosti s proti záchvátovými účinky. Ve formě valproátu sodného (uveden na trh pod názvem Depakin) byla využita k léčení některých typů epilepsie. Lék byl pacienty dobře tolerován, avšak u těhotných žen vyvolával vrozené vady plodů [52]. V roce 1985 tak došlo k velice důležitému objevu antiproliferačního účinku VPA. Důkaz podal Reaganův experiment: VPA při koncentraci 0,5 mM a 1 mM inhibovala mitotický index myších neuroblastomových (Neuro-2A) a krysích gliomových buněk (C6) [53]. Antiproliferační účinek VPA byl zaznamenán v G1 fázi buněčného cyklu, a to 6-6,5 hodiny před vstupem do S fáze [53]. Látky potlačující proliferaci mají dobrý předpoklad stát se antitumoriky, a proto byla VPA věnována další pozornost. V následujících letech proběhlo mnoho experimentů s VPA, což nakonec vedlo k navržení VPA jako protinádorového léku s minimálními vedlejšími účinky proti různým typům nádorů - nádory prsu, prostaty, tlustého střeva [53].





**Obrázek číslo 5. Strukturní vzorec kyseliny valproové.** Převzato z [53].

#### **1.4.1.1. Klinické studie**

Dosud provedené klinické studie nejčastěji zahrnují léčbu pacientů s AML, MDS, AML/MDS (akutní myeloidní leukemie/myelodysplastický syndrom) nebo solidními nádory [50]. V roce 2005 byla provedena studie u pacientů s AML/MDS, ve které bylo zahrnuto 75 pacientů [54]. Z toho 66-ti z nich byla podána VPA nejdříve jako monoterapie, později s přidáním ATRA („all trans retinoic acid“) u pacientů, kteří na léčbu nereagovali [54]. Průměrná doba léčení VPA byla 4 měsíce a doba podávání ATRA 2 měsíce. Hematologické zlepšení bylo pozorováno u 24 % pacientů. Úroveň odpovědi byla závislá na typu onemocnění dle klasifikace WHO (světová zdravotnická organizace). U MDS byla úroveň odpovědi 52 % [54]. V roce 2007 byla provedena první klinická studie VPA na pacientech se solidními nádory [55]. Experiment byl proveden při denních dávkách 30, 60, 90, 120 mg/kg (intravenósní podání). Léčba byla pacienty dobře tolerována pouze pacienty s denními dávkami 30 a 60 mg/kg. U pacientů s denními dávkami VPA 90, 120 mg/kg bylo pozorováno několik neurologických vedlejších efektů jako dezorientace, zmatení a další [55]. V periferních krevních lymfocytech pacientů byla detekována zvýšená acetylace histonů a snížená exprese HDAC 2 [55]. Účinek VPA byl také dále testován u nádorů děložního hrdla nebo plic [49, 50].

### **1.5. Hypoxie:**

Hypoxie je stav, kdy se buňka musí vyrovnat s nedostatkem kyslíku. Buněčná odpověď se může lišit od dočasných změn metabolismu až k permanentní restrukturalizaci krevních zásob. Selhání či špatná regulace tohoto mechanismu může vést k infarktu myokardu či růstu nádoru [56]. Ačkoliv jsou hypoxické podmínky toxické jak pro normální tak i nádorové buňky, u nádorových buněk dochází ke genetickým změnám, které jim pomáhají se s těmito podmínkami vyrovnat a dokonce se i dělit [57]. Studie také ukázaly, že

nedostatek kyslíku v nádorech vede ke zvýšení rizika vzniku metastáz a snižuje šanci na přežití pacientům, s nádory hlavy, krku a nebo prsou [57].

Je známo, že nádory mají velké požadavky na živiny a kyslík. Například růst maligních epiteliálních tumorů je omezen z důvodu nedostatečných zásob kyslíku a glukózy z krve. K tomu, aby nádor překonal toto omezení je potřeba několik faktorů. První faktor tvoří angiogeneze neboli novotvorba krevních kapilár potřebných pro výživu nádoru. Druhý faktor je hypoxie, nádorové buňky se mohou dělit velice rychle a tudíž se musí adaptovat na hypoxické podmínky. Klíčovou roli v této adaptaci hraje transkripční faktor HIF 1 (hypoxický indukibilní faktor 1). Nalezení odpovědné molekuly HIF 1, která umožňuje organismu se s nestandardními podmínkami vyrovnat, se podařilo skupině vedené Semenzou, Ratcliffem a Carem [56]. Výzkum Semenzovy skupiny vedl k odhalení transkripčního faktoru vázajícího se na specifickou část genu. Jelikož byl přítomný pouze u buněk v hypoxii, byl pojmenován HIF 1 $\alpha$  [56]. Závislost tvorby proteinu HIF 1 na hypoxických podmínkách ilustruje následující fakt: Exprese HIF 1 proteinů a vaznost na gen HIF 1 vykazuje exponenciální nárůst při snížené dostupnosti kyslíku (5 %-0 % O<sub>2</sub>) [56].

### **1.5.1. Hypoxický indukibilní faktor 1**

Buněčné kaskády indukované pomocí hypoxie ovlivňují jak růst nádoru tak i apoptózu. Rovnováha mezi těmito dvěma cestami se zdá být rozhodující pro růst nádoru v hypoxických podmínkách. Jedním ze způsobů odpovědi na nedostatek kyslíku je aktivace proteinu HIF 1. HIF 1 je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek, hypoxicky indukovatelné HIF 1 $\alpha$  a konstitutivně přepisované HIF 1 $\beta$ . Při nedostatku kyslíku se váže HIF 1 $\alpha$  na HREs („hypoxia response elements“) a tím aktivuje expresi genů jako např. VEGF, který podporuje angiogenezi [57]. HIF 1 $\alpha$  je sice přítomen i za normoxických podmínek, ale v normoxii je velmi rychle degradován tumor supresorovým proteinem VHL. VHL funguje jako ubikvitin ligasa E3 HIF 1 $\alpha$ , což vede k jeho destrukci v proteasomu. Jako čidlo nedostatku kyslíku slouží prolylové hydroxylasy, které hydroxylací prolinových residuí HIF 1 $\alpha$  regulují jeho interakci s VHL [57, 58].

HIF 1 aktivuje transkripci genů, které kódují proteiny účastnící se angiogeneze, metabolismu glukózy a nebo buněčné proliferace. Několik studií ukázalo, že zvýšená exprese HIF 1 $\alpha$  souvisí se zvýšenou úmrtností pacientů s nádory mozku, prsu a děložního čípku [59]. Nicméně zvýšená exprese HIF 1 $\alpha$  byla zaznamenána i u nádorů hlavy a krku a byla spojována se sníženou úmrtností [59]. Vliv HIF 1 $\alpha$  na prognózu pacientů tak pravděpodobně závisí na specifických podmínkách a genetických odlišnostech v různých typech nádorů.

## 1.6. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění patří k jednomu z nejvýznamnějších problémů moderní medicíny. Zpráva WHO uvádí, že v roce 2004 celosvětově na rakovinu zemřelo 7,4 milionu lidí. Prognózy uvádí, že v roce 2030 by to již mohlo být až 12 milionů lidí [60]. Vznik nádorových onemocnění je spojen s mnoha faktory, mezi které patří hlavně nesprávné stravovací návyky, nedostatek fyzické aktivity, kouření, alkohol nebo infekce. Statistiky také uvádějí, že výskyt nádorového onemocnění je nejčastější mezi 60. – 79. rokem života.

Vznik a rozvoj nádorů je několikastupňový proces. Nádory vznikají nekontrolovatelným dělením a růstem somatických buněk organismu. Rozlišuje se benigní (nezhoubný) nádor a maligní (zhoubný) nádor, který vytváří vzdálená ložiska tzv. metastáze. Vznik nádoru je spojen s pozměněním buněčné genetické informace způsobené například delecí, translokací či amplifikací určitých genů – tzv. onkogenů. Aby se buňka stala nádorovou, je k tomu potřeba několik mutací. Látky zodpovědné za vznik mutací genetické informace se nazývají karcinogeny a lze je rozdělit na fyzikální karcinogeny (např. ultrafialové a ionizační záření), chemické karcinogeny (např. azbest, arsen, radon) a biologické karcinogeny (např. rakovina jater je spojována s virem hepatitidy B) [60]. K rozvoji nádorových onemocnění také výrazně přispívají látky nazývané promotory (např. forbolester). Jsou to látky, které samy o sobě karcinogenní nejsou, ale nádorové bujení podporují.

### 1.6.1. Protoonkogeny a tumor supresorové geny

Protoonkogeny a tumorsupresorové geny tvoří dvě základní skupiny genů, jejichž porucha vede k nekontrolovatelnému buněčnému dělení. Protoonkogeny jsou normální součástí genomu a podílejí se zejména na regulaci buněčného růstu a diferenciaci buněk. Protoonkogeny mohou vystupovat jako růstové faktory, receptory růstových faktorů, transkripční faktory (jun, myb, c-myc, fos) nebo mohou být součástí signálních kaskád a fungují jako tzv. „přenašeči“ signálu. Zvýšená exprese protoonkogenů nebo jejich aktivace na onkogeny může proběhnout několika různými mechanismy. Všechny aktivační mechanismy mají jedno společné a to změnu genetické informace. Zvýšená exprese nebo transformace protoonkogenu na onkogen může být iniciována retroviry, mutací DNA, genovou amplifikací nebo chromozomální přestavbou. Genová amplifikace byla například zjištěna u onkogenu n-myc („myelocytomatosis viral related“ - „neuroblastoma derived“), kde se amplifikace vyskytuje ve formě extrachromozomálních tělísek dmin („double minute chromatin bodies“) [61].

Tumor supresorové geny někdy také nazývané antionkogeny brzdí zejména buněčné dělení, podporují apoptózu a účastní se buněčné diferenciace. Mutace těchto genů je

povětšinou spojována s inaktivací jejich funkce. Jedna z nejčastějších mutací vyskytující se u nádorových onemocnění (~ u 50% nádorů) je inaktivace tumor supresorového proteinu p53. Tento transkripční faktor kontroluje vstup buňky do S fáze buněčného cyklu. Jeho nefunkčnost může vést k programované buněčné smrti nebo ke genetické nestabilitě buňky a v důsledku i ke vzniku nádorového onemocnění.

### **1.6.2. Neuroblastom**

Neuroblastom patří mezi nejběžnější mimolebeční solidní nádory. Odvívá se od buněk nervové rýhy sympatického nervového systému. Nejčastěji se vyskytuje v oblasti břicha (70 %) a to z 50 % v nadledvině a přibližně 20 % bývá v hrudníku [62]. Uvádí se, že je zodpovědný přibližně za 15 % všech dětských úmrtí způsobených nádorovým onemocněním. Nejčastěji se vyskytuje v dětství a to u 50 % dětí mladších 2 let a 90 % dětí mladších 5 let [63]. Děti mladší 12 měsíců mají daleko lepší prognózy na vyléčení než děti starší 12 měsíců. Pokud jsou nádory ve svých počátcích vývoje, jsou obecně dobře léčitelné pomocí chemoterapie. Pokročilejší fáze neuroblastomů jsou naopak velice agresivní, odolné proti chemoterapii a prakticky neléčitelné [64].

Klinická vyšetření poukazují na závažnost nádoru a určují prognózu léčby. Prognóza léčby neuroblastomů je založena na rozvrstvení dle rizika do málo, středně a vysoce rizikového onemocnění. O tom, do které skupiny bude pacient zařazen rozhoduje věk pacienta, klasifikace dle INSS („International Neuroblastoma Staging System“) - stádia I, IIA, IIB, III, IV, IVs)), histopatologické vyšetření, přítomnost amplifikace MYCN genu a ploidie nádorových buněk [63,64]. Amplifikace MYCN (někdy také n-myc) onkogenu nebo jeho alelická ztráta na straně chromozomu 1p je spojena s agresivnějšími nádory a horšími prognózami pro pacienta [64]. Neuroblastomy s triploidním nebo hyperploidním obsahem DNA dobře reagují na chemoterapii a mají příznivou prognózu. Naopak neuroblastomy s diploidním obsahem DNA mají nepříznivou prognózu a zařazují se do skupiny s vysokým stupněm rizika [61].

Inhibitory HDACs jako např. VPA, TSA (trichostatin) nebo RA (kyselina retinová) ukázaly, že se mohou stát podpůrnými protinádorovými léčivy při léčbě různých typů nádorů včetně neuroblastomů.

## **2. Cíl bakalářské práce**

Cílem předkládané bakalářské práce bylo srovnání acetylace histonů H3 a H4 lidských neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 a SK-N-AS kultivovaných v normoxii a hypoxii. Dále vliv kyseliny valproové na acetylaci histonů H3 a H4 studovaných neuroblastomových buněčných linií.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Použité chemikálie

##### **B**

BIO-RAD (USA) - DC protein assay, Blotting-Grade Blocker non-fat dry milk (sušené odtučněné mléko), chemoluminiscenční kit-(Imunn-star HRP), sekundární kozí protilátka s HRP konjugátem proti králičí IgG, nitrocelulózová membrána, „fibery“, filtrační papíry (blot), sekundární kozí protilátka s HRP konjugátem proti myší IgG

##### **F**

Fermentas (Kanada) - PageRuler™ Prestained Protein Ladder (elektroforetický standard složený z rekombinantních prokaryotických proteinů)

Fluka (Švýcarsko) - APS (ammonium persulfate) , ponceau, glycin

##### **G**

GIBCO™ (Velká Británie) - PBS (fosfátový pufr se solí), trypsin, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina), DTT (dithiothreitol), PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid)

##### **L**

Lonza (Švýcarsko) - IMDM („Iscove's modified Dulbecco's medium“)

Lachema (ČR) - Tris ( 2-amin-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol),

Linde (ČR) - kalibrační plyn (1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, zbytek N<sub>2</sub>), medicínální CO<sub>2</sub>

Lach-Ner (ČR)- KCl (chlorid draselný), MgCl<sub>2</sub> (chlorid hořečnatý)

##### **M**

Millipore (USA) - primární polyklonální králičí protilátka anti-acetyl-H3 a anti-acetyl-H4

##### **P**

PAA (Rakousko) - FBS (fetální hovězí sérum)

Penta (ČR) – HCl (kyselina chlorovodíková) , CH<sub>3</sub>COOH (kyselina octová), CH<sub>3</sub>OH (methanol)

## S

Sigma (USA) - AA mix (akrylamid:bisakrylamid = 29:1), SDS (dodecylsulfát sodný), primární myší protilátka anti-aktin, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin), VPA (valproát), TWEEN 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát)

V průběhu experimentů byla používána destilovaná voda upravovaná přístrojem Millipore Direct – Q3 UV.

Použité chemikálie byly čistoty p.a. či lepší.

Neuroblastomová linie SK-N-AS byla zakoupena od firmy ECACC (Salisbury, UK)  
Neuroblastomová linie UKF-NB-3 byla darem pana profesora Činátla (Goethova universita, Frankfurt, Německo).

### 3.2. Buněčné kultury

Kultivace buněčných linií proběhla v IMDM médiu obohaceném o 10 % FBS v inkubátoru Jouan IGO 150 při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosti vzduchu. Buňky byly inkubovány v hypoxických (Modulator incubator chamber od firmy Billups-Rothenberg a normoxických podmínkách po dobu 6, 12, 18 a 24 hodin s přidavkem i bez přidavku 2 mM VPA. Po ukončení inkubace byly buňky z kultivačních misek mechanicky sklizeny. Poté byly buňky centrifugovány při 2500 RPM 2 minuty na centrifuze firmy Hettich GmbH&Co.KG, resuspendovány v 1 ml PBS a za stejných podmínek znovu centrifugovány. PBS bylo odstraněno a získané pelety uskladněny při -80°C.

### 3.3. Kyselá extrakce histonů

Pelety byly resuspendovány v dvojnásobném objemu lyzačního pufru (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 1,5 mM PMSF). Kyselá extrakce byla provedena přidáním kyseliny chlorovodíkové (výsledná koncentrace HCl 0,2M). Extrakce probíhala 30 minut na ledu. Po 10-ti minutové centrifugaci (Eppendorf Centrifuge 5415 R ) při 11000x g , 4 °C byl odebrán supernatant a uložen do -80 °C. Vzorky byly poté dialyzovány.

### 3.3.1. Dialýza

Dle pokynů výrobce byly na dialyzační membrány (Micro Dispodialyzer, Harvard Aparatus) nanášeny izolované proteiny a smočeny do dialyzačního roztoku - 0,1M kyseliny octové. Dialýza oproti kyselině octové proběhla 2x po dobu 60 minut. Buněčné lyzáty byly ještě 2x dialyzovány oproti ddH<sub>2</sub>O nejprve 1 hodinu a poté přes noc. Následně byla v buněčných lyzátech stanovena koncentrace proteinů.

### 3.3.2. Stanovení proteinů

Stanovení proteinů proběhlo podle Lowryho metody za použití kitu na stanovení proteinů (DC Protein Assay od firmy BIO-RAD). Na mikrotitrační destičku bylo aplikováno 5 µl standardu (BSA) v dubletovém uspořádání a 5 µl vzorků v tripletovém uspořádání. Ke vzorkům i standardu bylo přidáno 25 µl roztoku A' (připraven smícháním roztoku A a S v poměru 50:1) a poté 200 µl roztoku B. Směs byla za stálého míchání inkubována na přístroji Gyrotwister S100 od firmy Labnet po dobu 15 minut. Intenzita modrého zabarvení byla měřena na spektrofotometru Molecular Devices VERSAmax při 750 nm a vyhodnocena programem SoftMax Pro.

## 3.4. Elektroforetická separace proteinů

Elektroforetická separace proteinů v přítomnosti dodecylsulfátu sodného byla provedena ve vertikálním uspořádání na polyakrylamidovém gelu na aparatuře od firmy Sigma. Rozdělovací 16 % gel byl připraven z 3,75 ml 1M Tris pH 8,8; 3,94 ml 40 % AA mix; 10 µl TEMED; 100 µl 10% SDS; celé doplněno ddH<sub>2</sub>O do 10 ml a přidáno 100 µl 10 % APS. Poté byl připraven 6 % zaostřovací gel (1,25ml 1M Tris pH 6,8; 750 µl 40 % AA mix; 50 µl 10 % SDS; 10 µl TEMED; celé doplněno ddH<sub>2</sub>O do 5 ml a přidáno 50 µl 10 % APS). 5 µg a/nebo 10 µg proteinů bylo naředěno v poměru 5:1 vzorkovým pufrům (8,965 ml glycerolu; 1,833 ml merkptoethanolu; 9,202 ml ddH<sub>2</sub>O; 0,9085 g Tris HCl pH 6,8; 2,0349 SDS; 0,0068 g bromphenol blue) a zahřáto 5 minut při teplotě 95 °C. Elektrodový pufr byl připraven rozpuštěním 1,51 g Tris, 9,4 g glycinu, 0,5 g SDS ve 450 ml ddH<sub>2</sub>O. Elektroforetická separace byla spuštěna poté, co jednotlivé vzorky a elektroforetický standard (PageRuler<sup>TM</sup>) byly nanášeny do jamek. Elektroforetické dělení probíhalo na zdroji BIO-RAD-Power pac 3000 při konstantním proudu 40 mA po dobu přibližně 80 minut. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly dále přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot.



### 3.5 Western blot

V transferovém pufru (3,05 g Tris; 14,5 g glycin; 10 % methanol) byla smočena nitrocelulózová membrána spolu s „fibery“ a filtračními papíry. Do přenosové aparatury od firmy BIO-RAD byly postupně vkládány: „fiber“, filtrační papír, gel, nitrocelulózová membrána, filtrační papír a „fiber“. Přenos probíhal za stálého chlazení při 350 mA po dobu 80 minut. Membrána byla obarvena roztokem ponceau, odbarvena pomocí PBS a 1 hodinu pomalu blokována v 5 % blokovacím roztoku (5 % mléko, PBS, 0,25 % TWEEN) na přístroji Gyrotwister S100 od firmy Labnet. Poté byla přenesena do 50 ml zkumavky a za stálého míchání inkubována přes noc při 4°C v 5 % blokovacím roztoku s primární králičí protilátkou anti-acetyl-H3 (ředění 1:20 000) nebo s anti-acetyl-H4 (ředění 1:10 000).

Následující den byla membrána promyta v PBS/TWEEN (PBS, 0,25 % TWEEN) a v 0,1 % blokovacím roztoku byla připravena sekundární kozí protilátka proti IgG králičí (ředění 1:2000). Membrána byla postupně v přístroji Snap i.d. (Millipore) promyta 4x v PBS/TWEEN a 10 minut inkubována se sekundární protilátkou (ředění 1:2000). Po předchozím promytí 4x v PBS/TWEEN, byla převrstvena vyvolacím roztokem (BIO-RAD-Imunn-Star HRP chemoluminiscenční kit) a s ním inkubována 3 minuty. Vyvolání proběhlo na MEDIX XBU medical x-ray film na přístroji FOMA optimax v kazetě od firmy CAWO. Doba expozice se při jednotlivých experimentech lišila.

Membrána byla dále promyta v PBS a 7 minut v odmyvacím roztoku (14,61g NaCl; 14,31 ml CH<sub>3</sub>COOH; doplněno ddH<sub>2</sub>O do 500 ml). Dále pak byla promyta 2 x 7 minut v PBS a poté blokována 1 hodinu v 5 % blokovacím roztoku a přes noc inkubována s primární myší protilátkou anti-aktin (ředění 1:2000). Poté byl dodržován stejný postup jako v kapitole 3.5. (viz odstavec 2). Sekundární protilátka byla použita kozí proti IgG myší (ředění 1:2000).

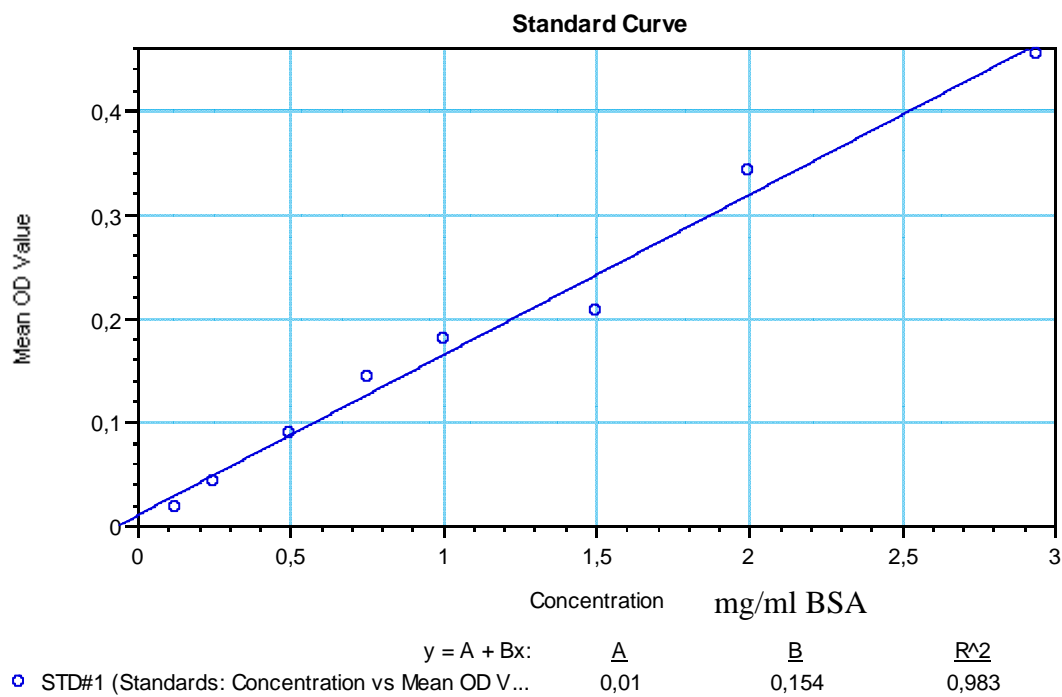
## 4. Výsledky

V současné době je věnována velká pozornost nádorovým onemocněním a jejich léčbě. Jedna z potencionálních látek pro léčbu nádorových onemocnění je inhibitor histondeacetylasy (HDACi) kyselina valproová (VPA). V klinických studiích byla VPA testována jako samostatné chemoterapeutikum (u pacientů s AML/MDS) nebo v kombinaci s jinými protinádorovými léčivy např. u AML, MDS, nádorů prsu a plic [49]. Mezi potenciální terapeutický cíl VPA patří i neuroblastom. První experiment s VPA *in vivo* byl proveden na myších, kterým byla transplantována lidská neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-3 [65]. Myším byla podávána VPA při denní dávce 200 mg/kg a 400 mg/kg. Účinek VPA na linii UKF-NB-3 byl následně zjištěn pomocí histopatologického vyšetření [65]. Protinádorové účinky VPA u neuroblastomové linie UKF-NB-3 zahrnovaly indukci apoptózy či zastavení růstu nádoru [65]. Studie provedené na dalších neuroblastomových liniích Neuro 2A, BE(2)-C, UKF-NB-3, UKF-NB-2 zahrnovaly zastavení růstu, snížení angiogeneze, indukci proliferace, snížení exprese n-myc onkoproteinu či hyperacetylaci histonů H3 a H4 [53, 65, 66]. Dle odlišných morfologických a růstových charakteristik můžeme neuroblastomové linie rozlišit na tři typy: S-typ („Schwanian precursor“), N-typ („neuroblastic precursor“) a I-typ („intermediate“) [67].

V této práci je ukázáno, jak se liší acetylace histonů H3 a H4 neuroblastomových linií SK-N-AS (S-typ) a UKF-NB-3 (N-typ) po vystavení 2 mM VPA. Jelikož je nádorové prostředí charakterizováno hypoxickými podmínkami (<1 % O<sub>2</sub>), bylo pro simulaci tohoto prostředí provedeno srovnání účinku VPA na acetylaci histonů v normoxii a v hypoxii.

### 4.1. Stanovení koncentrace proteinů

Po kultivaci a lýze buněk byla v jednotlivých vzorcích stanovena koncentrace proteinů. Závislost optické denzity na různé koncentraci standardu (BSA) je vynesena v kalibračních křivkách. Pro UKF-NB-3 je kalibrační křivka zobrazena na **straně 35 (obrázek č. 6)** a pro SK-N-AS na **straně 37 (obrázek č. 7)**. Z kalibračních křivek byly pomocí programu SoftMax Pro získány hodnoty koncentrace proteinů. Získaná data jsou pro UKF-NB-3 zaznamenána na **straně 36 (tabulka č. 5)** a pro SK-N-AS na **straně 38 (tabulka č. 6)**.

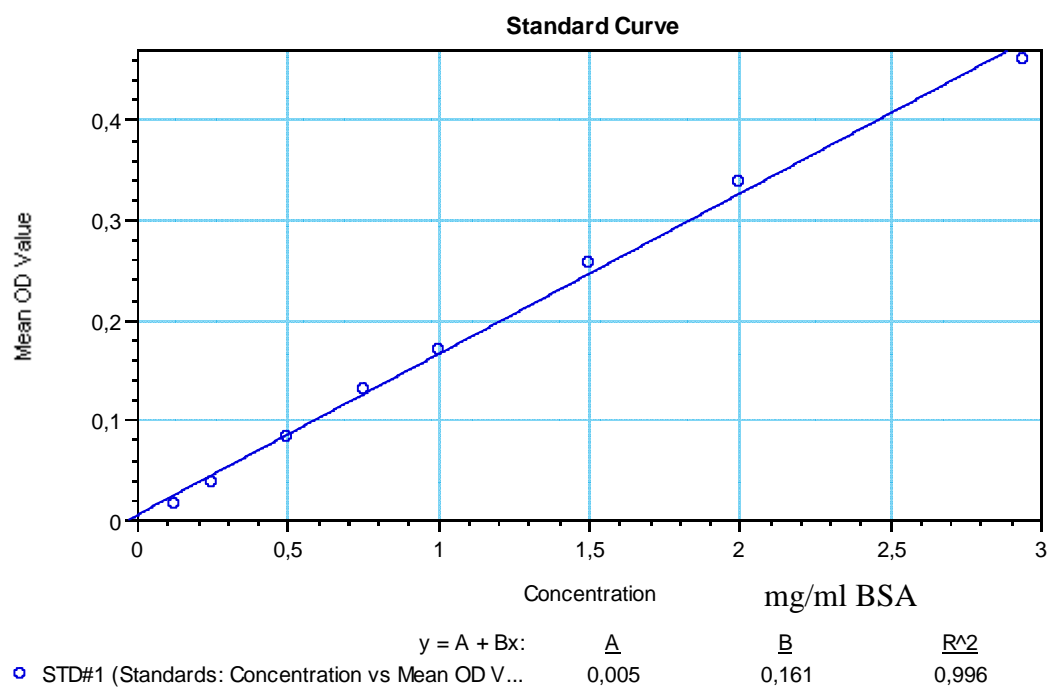


**Obrázek číslo 6. Kalibrační křivka stanovených koncentrací BSA.** Vytvořeno programem SoftMax Pro.

**Tabulka číslo 5. Stanovení koncentrace proteinů u lyzátů buněk neuroblastomové linie UKF-NB-3. Vytvořeno programem SoftMax Pro.**

Vzorek	Optická denzita	Koncentrace [mg/ml]	Průměrná koncentrace [mg/ml]	Směrodatná Odchylka	Ředění	Výsledná koncentrace [mg/ml]
6 h normoxie VPA	0,111	0,656	0,689	0,035	4	2,757
	0,122	0,726				
	0,116	0,685				
12 h normoxie VPA	0,130	0,779	0,784	0,041	4	3,137
	0,138	0,828				
	0,125	0,746				
18 h normoxie VPA	0,103	0,602	0,561	0,036	4	2,244
	0,094	0,548				
	0,092	0,533				
24 h normoxie VPA	0,155	0,941	0,917	0,137	4	3,666
	0,170	1,040				
	0,128	0,768				
24 h normoxie ko.	0,161	0,980	1,031	0,137	4	4,123
	0,193	1,186				
	0,153	0,926				
6 h hypoxie ko.	0,151	0,915	0,858	0,067	4	3,431
	0,145	0,874				
	0,131	0,785				
6 h hypoxie VPA	0,161	0,980	1,023	0,038	4	4,093
	0,172	1,048				
	0,171	1,042				
12 h hypoxie ko.	0,219	1,356	1,399	0,056	4	5,598
	0,223	1,379				
	0,236	1,463				
12 h hypoxie VPA	0,188	1,154	1,006	0,175	4	4,026
	0,190	1,052				
	0,179	0,814				
18 h hypoxie ko.	0,188	1,153	1,14	0,037	4	4,561
	0,190	1,169				
	0,179	1,098				
18 h hypoxie VPA	0,150	0,910	0,872	0,071	4	3,490
	0,151	0,916				
	0,132	0,791				
24 h hypoxie ko.	0,235	1,463	1,533	0,068	4	6,133
	0,256	1,597				
	0,247	1,540				
24 h hypoxie VPA	0,115	0,684	0,632	0,202	4	2,529
	0,134	0,803				
	0,073	0,409				

Poznámka: koncentrace VPA byla 2 mM.



**Obrázek číslo 7. Kalibrační křivka stanovených koncentrací BSA.** Vytvořeno programem SoftMax Pro.

**Tabulka číslo 6. Stanovení koncentrace proteinů u lyzátů buněk neuroblastomové linie SK-N-AS. Vytvořeno programem SoftMax Pro.**

Vzorek	Optická densita	Koncentrace [mg/ml]	Průměrná koncentrace [mg/ml]	Směrodatná Odchylka	Ředění	Výsledná koncentrace [mg/ml]
6 h normoxie VPA	0,222	1,403	1,400	0,027	4	5,599
	0,226	1,425				
	0,217	1,371				
12 h normoxie VPA	0,114	0,709	0,718	0,024	4	2,871
	0,120	0,745				
	0,113	0,700				
18 h normoxie VPA	0,096	0,595	0,539	0,094	4	2,157
	0,071	0,431				
	0,096	0,592				
24 h normoxie VPA	0,226	1,429	1,506	0,081	4	6,026
	0,251	1,590				
	0,237	1,500				
24 h normoxie ko.	0,262	1,656	1,635	0,059	4	6,538
	0,265	1,680				
	0,248	1,568				
6 h hypoxie ko.	0,139	0,866	0,861	0,048	4	3,446
	0,145	0,907				
	0,130	0,811				
6 h hypoxie VPA	0,068	0,392	0,398	0,059	4	1,591
	0,079	0,460				
	0,060	0,341				
12 h hypoxie ko.	0,067	0,389	0,399	0,031	1	0,399
	0,075	0,433				
	0,065	0,373				
12 h hypoxie VPA	0,183	1,110	1,102	0,157	4	4,409
	0,206	1,255				
	0,156	0,941				
18 h hypoxie ko.	0,041	0,236	0,239	0,004	2	0,479
	0,042	0,243				
	0,041	0,239				
18 h hypoxie VPA	0,113	0,702	0,679	0,020	6	4,075
	0,108	0,668				
	0,108	0,667				
24 h hypoxie ko.	0,246	1,558	1,600	0,074	4	6,399
	0,266	1,685				
	0,246	1,555				
24 h hypoxie VPA	0,184	1,157	1,221	0,103	4	4,883
	0,212	1,399				
	0,185	1,165				

Poznámka: koncentrace VPA byla 2 mM.

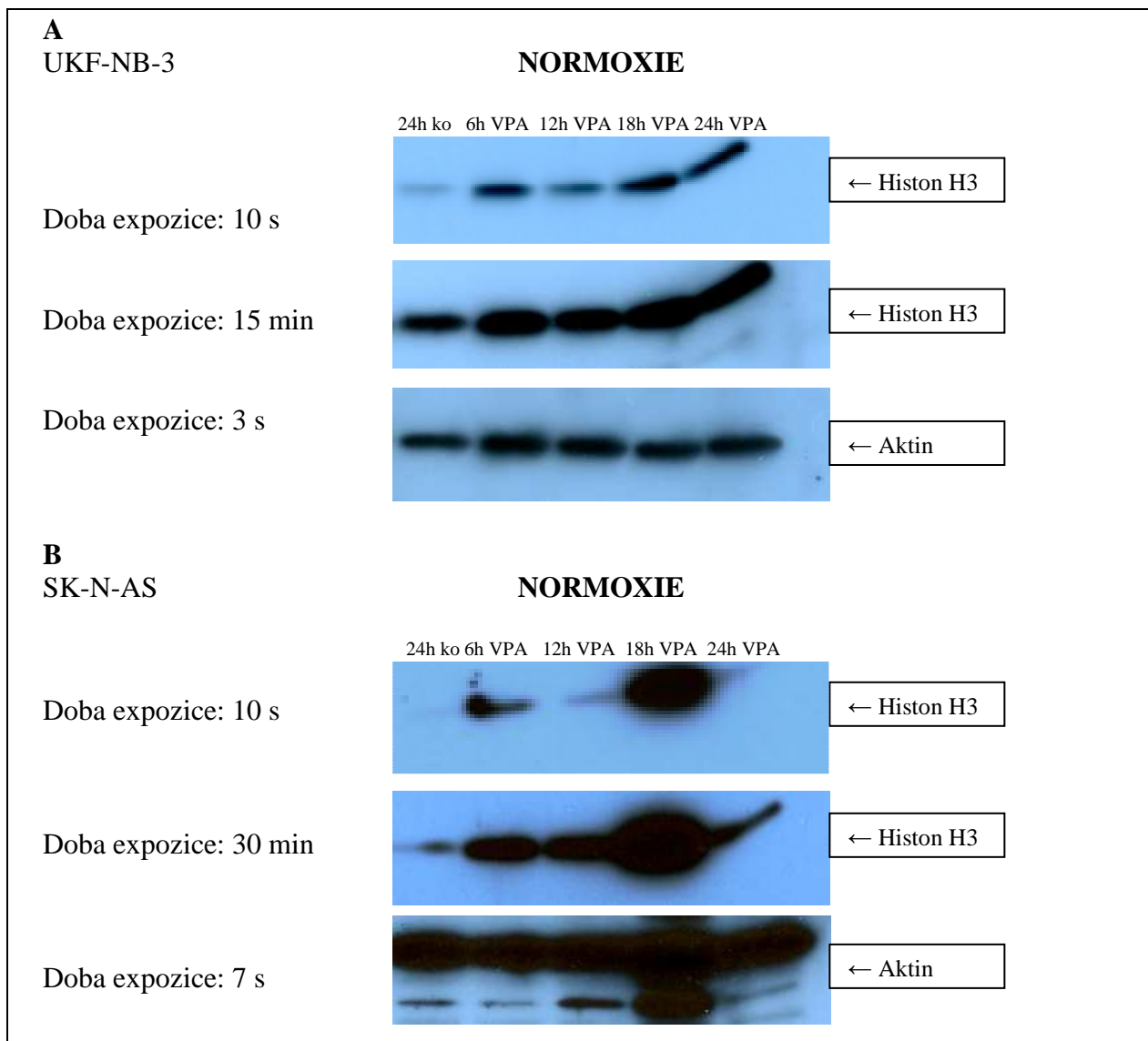
## 4.2. Acetylace histonů H3 a H4 neuroblastomových linií

Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a SK-N-AS byly inkubovány s 2 mM VPA po dobu 6, 12, 18 a 24 h v normoxických a paralelně v hypoxických podmínkách. Pomocí specifické protilátky anti-acetyl-H3 nebo anti-acetyl-H4 byla u těchto linií metodou Western blot detekována acetylace histonů H3 a H4. Stejně množství nanesených proteinů při elektroforetické separaci bylo ověřeno detekcí aktinu.

### 4.2.1. Acetylace histonů H3 v normoxii

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a SK-N-AS kultivované s 2 mM VPA v normoxických podmínkách vykazují zvýšenou acetylaci H3 a H4 oproti kontrolním vzorkům. U SK-N-AS (**str. 40 obrázek č. 8**) i UKF-NB-3 (**str. 40 obrázek č. 8**) acetylace stoupá se zvyšující se dobou inkubace a dosahuje svého maxima po 18 hodinové inkubaci s VPA. S delší dobou inkubace se acetylace snižuje. Tyto výsledky přibližně korespondují s publikovanými experimenty, které ukazují nejvyšší acetylaci H3 u nádorových buněčných linií F9 teratokarcinom a HeLa po 12 a 16 hodinách [68]. Jak lze vidět na **obrázku č. 8 na straně 40**, acetylace histonů H3 se u studovaných neuroblastomových buněčných linií liší. 24 hodinová inkubace s VPA vede u linie SK-N-AS k nižší acetylaci H3 ve srovnání se stejným vzorkem UKF-NB-3. Vzniklé rozdíly mohou být způsobeny různým účinkem VPA na neuroblastomové linie odlišného typu. Zatímco přídavek 2 mM VPA do kultivačního média výrazně snižuje životaschopnost (viabilitu) UKF-NB-3 životaschopnost SK-N-AS zůstává téměř 100 % [69]. Je tedy možné, že N-typ neuroblastomové linie (UKF-NB-3) je obecně více citlivý vůči VPA, což se může projevit i v rozdílné acetylaci histonů H3 a H4, a to jak v normoxii tak i hypoxii.

Obecné rozdíly mezi acetylacemi neuroblastomových linií mohou být také způsobeny rozdílnou aktivitou nebo expresí HATs a HDACs. Nicméně tento předpoklad bude třeba ještě experimentálně ověřit.



**Obrázek číslo 8. Acetylace histonů H3 v normoxii detekovaná metodou Western blot.**

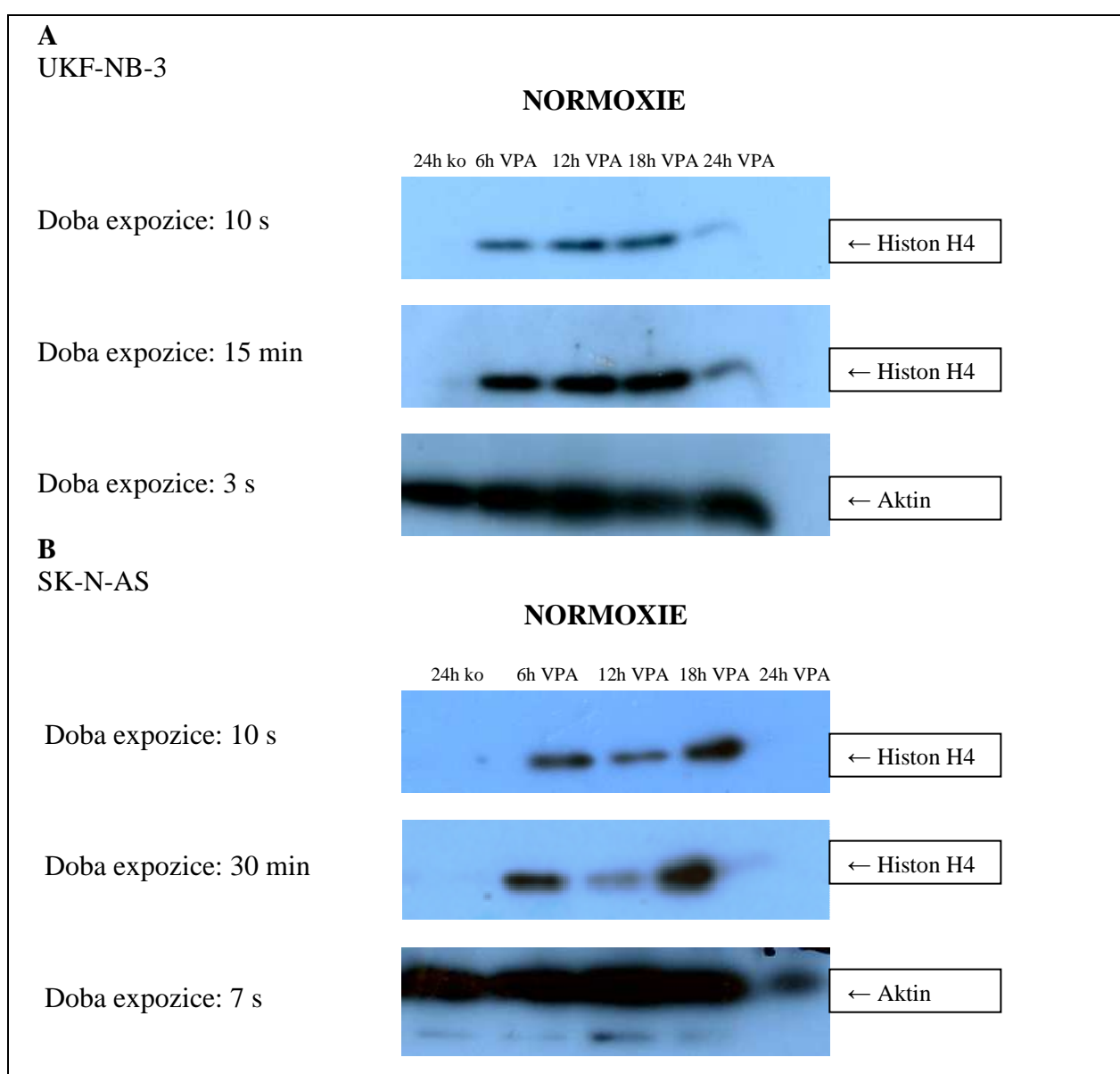
Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a SK-N-AS byly inkubovány po dobu 6, 12, 18 a 24 hodin v normoxických podmínkách (~21 % O<sub>2</sub>) s přídavkem i bez přídavku 2 mM VPA. **A)** Acetylace H3 v normoxii stoupá s rostoucí dobou inkubace do 18 hodin a poté mírně klesá. **B)** Masivní acetylaci H3 buněčné linie SK-N-AS lze nalézt po 18 hodinové inkubaci s VPA. Masivní acetylace H3 po 18 hodinové inkubaci s VPA byla pravděpodobně způsobena nepřesným nanesením vzorku při elektroforetické separaci. Pokles acetylace H3 po 24 hodinách je u buněčné linie SK-N-AS vystavené VPA výraznější než u druhé studované neuroblastomové linie.



#### 4.2.2. Acetylace histonů H4 v normoxii

Neuroblastomové buněčné linie kultivované s 2 mM VPA v normoxických podmínkách vykazují zvýšenou acetylaci H4 oproti kontrolním vzorkům. U obou neuroblastomových buněčných linií (**UKF-NB-3 a SK-N-AS obrázek č. 9 s popisem na str. 41-42**) byla detekována nejvyšší acetylace H4 po 18 hodinové inkubaci s VPA. Rozdíly v acetylaci histonů H4 buněčné linie SK-N-AS jsou po 6, 12 a 18 hodinové inkubaci s VPA výraznější než u druhé studované linie. Pokles acetylace H4 po 24 hodinové inkubaci s VPA je u buněčné linie SK-N-AS výraznější než u linie UKF-NB-3.

Získané výsledky acetylací H4 v hypoxii odpovídají dosud publikovaným experimentům, které ukazují nejvyšší acetylaci H4 po ~ 16 hodinové inkubaci s VPA [68].



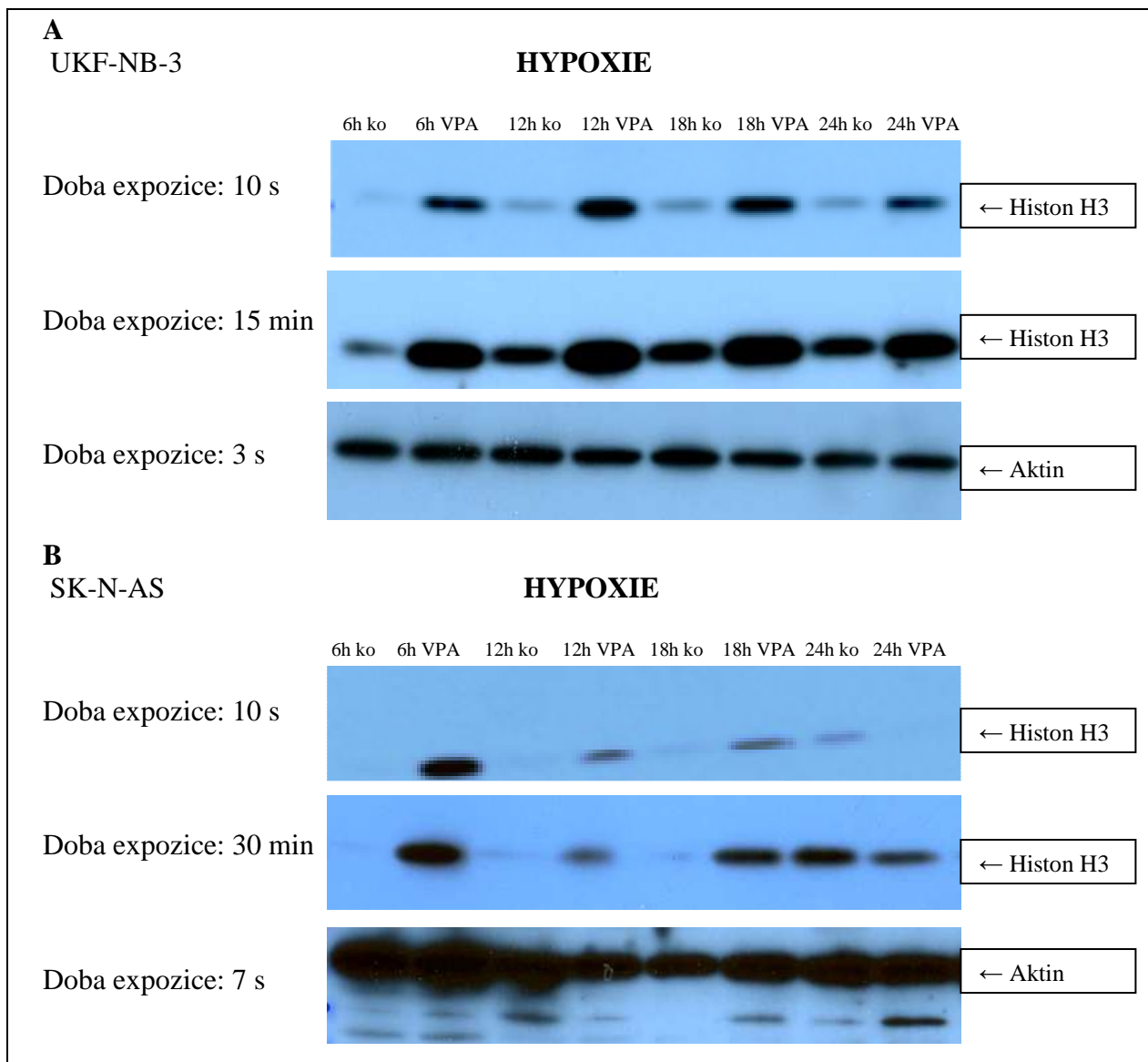
**Obrázek číslo 9. Acetylace histonů H4 v normoxii detekovaná metodou Western blot.**

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a SK-N-AS byly inkubovány po dobu 6, 12, 18 a 24 hodin v normoxických podmínkách (~21 % O<sub>2</sub>) s přídavkem i bez přídavku 2 mM VPA. **A)** Nejvyšší acetylce H4 byla detekována u neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 po 12-18 hodinové inkubaci s VPA. **B)** Nejvyšší acetylaci histonu H4 lze nalézt po 18 hodinách u neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS vystavené 2 mM VPA. Pokles acetylce H4 po 24 hodinové inkubaci s VPA je u buněčné linie SK-N-AS výraznější než u druhé studované linie. Pokles acetylce H4 je pravděpodobně způsoben různou citlivostí neuroblastomových buněčných linií vůči VPA.

#### 4.2.3 Acetylce histonů H3 v hypoxii

U buněčné neuroblastomové linie UKF-NB-3 (**obrázek č. 10, str. 43**) dochází při kultivaci buněk v hypoxických podmínkách k nejvyšší acetylaci H3 po 12-18 hodinové inkubaci s VPA. Následně dochází u této linie k poklesu acetylce H3 po 24 hodinové inkubaci s VPA. Acetylce H3 buněčné linie UKF-NB-3 je v hypoxii po 24 hodinové inkubaci s VPA srovnatelná s 6 hodinovou inkubací s VPA.

Nejvyšší acetylce H3 neuroblastomové linie SK-N-AS byla v hypoxii detekována po 6 hodinové inkubaci s VPA. Acetylce H3 po 12 a 24 h je v hypoxii u buněčné linie SK-N-AS vystavené 2 mM VPA (**obrázek č. 10, str. 43**) výrazně nižší než u druhé studované linie. Rozdíl v acetylaci mezi dvěma neuroblastomovými liniemi pravděpodobně vznikl nepřesným nanesením vzorků (dokládá to aktin). Ke zvýšené deacetylaci v hypoxii může přispívat zvýšená exprese některých HDACs např. (HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3) [70].

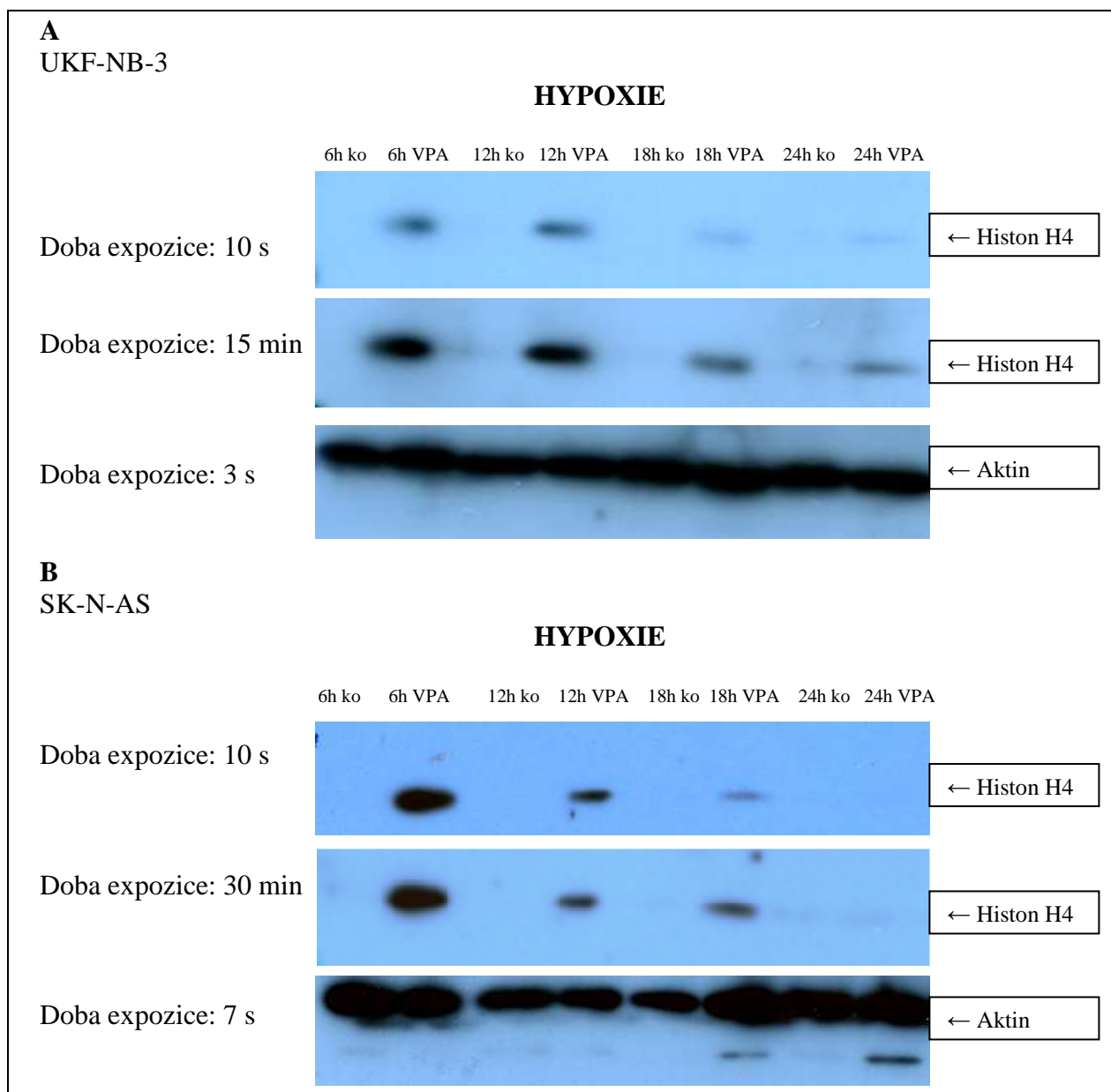


**Obrázek číslo 10. Acetylace histonů H3 v hypoxii detekovaná metodou Western blot.**

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a SK-N-AS byly inkubovány po dobu 6, 12, 18 a 24 h v hypoxických (1 % O<sub>2</sub>) podmínkách s přidavkem i bez přidavku 2 mM VPA. **A)** Nejvyšší acetylce H4 buněčné linie UKF-NB-3 byla detekována po 12-18 hodinové inkubaci s VPA. **B)** Nejvyšší acetylce H3 buněčné linie SK-N-AS byla detekována po 6 hodinové inkubaci s VPA. Snížená detekce acetylce H3 u buněčné linie SK-N-AS po 12 a 24 hodinové inkubaci s VPA byla pravděpodobně způsobena nepřesným nanesením vzorků při elektroforetické separaci.

#### 4.2.4. Acetylace histonů H4 v hypoxii

Neuroblastomové buněčné linie kultivované s 2 mM VPA v hypoxických podmínkách vykazují zvýšenou acetylaci H4 oproti kontrolním vzorkům. Nejvyšší acetylace H4 v hypoxii byla u neuroblastomové linie UKF-NB-3 (**obrázek č. 11 str. 45**) detekována po 6-12 hodinové inkubaci s VPA a u linie SK-N-AS (**obrázek č. 11 str. 45**) po 6 hodinové inkubaci s VPA. V literatuře byla za hypoxických podmínek popsána závislost acetylace H4 na míře exprese c-myc a zároveň bylo zjištěno, že c-myc přímo vyvolává acetylaci H4 [71]. Zatímco hladina c-myc se v normoxii nemění, v hypoxii exprese c-myc klesá s prodlužující se dobou inkubace [71]. Bylo prokázáno, že VPA s rostoucí dobou inkubace hladinu c-myc snižuje a spolu s ní i acetylaci H4 [72]. K ranné hyperacetylaci může také přispívat zvýšená exprese proteinů angiogeneze jako je například HIF 1 $\alpha$  [73]. Průběh exprese HIF 1 $\alpha$  v hypoxii odpovídá zjištěnému průběhu snižující se acetylace H4 [73]. Je tedy pravděpodobné, že spolu tyto dva děje velice úzce souvisí. U obou neuroblastomových linií jsou získané výsledky acetylace H4 v hypoxii velice podobné. K acetylačním rozdílům může stejně jako u H3 přispívat rozdílná aktivita některých HDACs (např. HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3) [70].



**Obrázek číslo 11. Acetylace histonů H4 v hypoxii detekovaná metodou Western blot.**

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a SK-N-AS byly inkubovány po dobu 6, 12, 18 a 24 hodin v hypoxických (1 % O<sub>2</sub>) podmínkách s přidavkem a bez přidavku 2 mM VPA.

**A)** Nejvyšší acetylaci histonu H4 lze nalézt již po 6 a 12 hodinách u buněčné linie UKF-NB-3 vystavené 2 mM VPA. S delší dobou inkubace se acetylace H4 snižuje.

**B)** Buněčná linie SK-N-AS vykazuje podobné výsledky v acetylaci H4 jako druhá studovaná neuroblastomová linie. Tedy nejvyšší acetylace H4 byla detekována po 6 hodinové inkubaci s 2 mM VPA. Po 24 hodinové inkubaci s VPA již acetylace H4 u buněčné linie SK-N-AS nebyla detekována.

## 5. Diskuse

Za jeden z hlavních protinádorových účinků VPA je považována hyperacetylace histonů H3 a H4 a nehistonových proteinů. Vliv VPA na acetylaci histonů byla ověřována u několika typů nádorových linií [68, 74, 75]. Ve všech studiích zvýšila VPA (koncentrace 0,3-5mM) acetylaci histonů H3, H4. Hyperacetylace histonů může indikovat zvýšení či snížení exprese některých proteinů. Myc proteiny (c-myc, n-myc) ovlivňují proliferační a apoptotické dráhy, které jsou podstatné pro rozvoj maligních onemocnění. Zatímco c-myc je u normálních proliferujících buněk exprimován na nízké hladině, jeho zvýšená exprese je často nalezena u mnoha maligních onemocnění [71, 72].

U neuroblastomových linií byla nalezena amplifikace genu, který kóduje onkoprotein n-myc. Zvýšená exprese n-myc hraje rozhodující roli pro prognózu pacienta. VPA prokázala schopnost snížit expresi n-myc u neuroblastomové linie UKF-NB-3 a c-myc u AML [66, 72]. Byl prokázán přímý vztah mezi acylací H4 a expresí c-myc. Hladina c-myc proteinu klesá v hypoxii s prodlužující se dobou kultivace a tím může být v hypoxii způsobena snížená acetylace H4 po 18 a 24 hodinové inkubaci s VPA. Je pravděpodobné, že prostřednictvím hyperacetylace histonů se tak snižuje i exprese n-myc.

Ranná hyperacetylace také může být spojena se zvýšenou expresí proteinů angiogeneze. Je známo, že exprese HIF 1 $\alpha$  v hypoxii se s rostoucí dobou inkubace snižuje [71]. HIF 1 $\alpha$  tak může přispívat k počáteční hyperacetylaci H4. Odpovídá tomu i skutečnost, že VPA hladinu HIF 1 $\alpha$  snižuje a pravděpodobně s tím i acylaci H4 [73].

Bylo zjištěno že, přidavek 2 mM VPA do kultivačního média výrazněji snižuje životaschopnost neuroblastomové linie UKF-NB-3 než životaschopnost linie SK-N-AS [69]. Toto zjištění naznačuje vyšší citlivost neuroblastomové linie UKF-NB-3 k VPA než linie SK-N-AS. Vyšší citlivost linie UKF-NB-3 k VPA může přispívat k pomalejší deacetylaci histonů H3 a H4. Potvrzují to i získané výsledky, kde histony H3 a H4 neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS jsou po 24 hodinové inkubaci s VPA oproti UKF-NB-3 méně acetylovány. K rozdílné acetylaci neuroblastomových linií také mohou přispívat rozdílné aktivity či exprese HATs a HDACs. V hypoxických podmínkách to dále může být zvýšená exprese některých HDACs [70].

## 6. Závěr

Byla provedena detekce acetylace histonů H3 a H4 neuroblastomových buněčných linií UKF-NB-3 a SK-N-AS vystavených 2 mM VPA v normoxických a hypoxických podmínkách. Bylo zjištěno, že VPA zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4 v normoxii i hypoxii.

### UKF-NB-3

- Acetylace histonů H3 a H4 v normoxii byla nejvyšší u neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 po 18 hodinové inkubaci s VPA.
- Nejvyšší acetylace histonů H3 v hypoxii byla detekována po 12-18 hodinové inkubaci s VPA. Nejvyšší acetylace histonů H4 byla v hypoxii detekována již po 6-12 hodinové inkubaci s VPA.

### SK-N-AS

- Maximální acetylace histonů H3 a H4 v normoxii bylo dosaženo po 18 hodinách u neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS vystavené VPA.
- Nejvyšší acetylace histonů H3 a H4 byla v hypoxii detekována již po 6 hodinové inkubaci s VPA.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) Verdone L., Agricola E., Caserta M., Di Mauro E., *Histone acetylation in gene regulation*, Brief Funct Genomic Proteomic, 5, str. 209-221 (2006)
- 2) Spencer V.A., Davie J.R., *Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression*, Gene, 240, str. 1–12 (1999)
- 3) Turner B. M., *Histone acetylation and an epigenetic code*, Bioessays, 22, str. 836-845 (2000)
- 4) Ramakrishnan V., *Histone structure and the organization of the nucleosome*, Annu Rev Biophys Biomol Struct, 26, str. 83-112 (1997)
- 5) Wolffe A.P., Guschin D., *Chromatin structural features and targets that regulate transcription*, J Struct Biol, 129, str. 102-122 (2000)
- 6) Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T. J., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*, Nature, 389, str. 251-260 (1997)
- 7) Travers A. A., *DNA bending and nucleosome positioning*, Trends Biochem Sci, 12, str. 108–112 (1987)
- 8) Shen X., Yu L., Weir J.W., Gorovsky M.A., *Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo*, Cell, 82, str. 47-56(1995)
- 9) Füllgrabe J., Hajji N., Joseph B., *Cracking the death code: apoptosis-related histone*, Cell Death and Differentiation, 17, str. 1238–1243 (2010)
- 10) Luger K., Richmond T. J., *The histone tails of the nucleosome*, Curr Opin Genetics Dev, 8, str. 140-146 (1998)
- 11) Lee K.M., Hayes J.J., *Linker DNA and H1 dependent reorganization of histone - DNA interactions within the nucleosome*, Biochemistry-US, 37, str. 8622–8628 (1998)



- 12) Strahl B.D., C.D. Allis, *Language of covalent histone modifications*, Nature, 403, str. 41-45 (2000)
- 13) Kouzarides T., *Chromatin modifications and their function*, Cell, 128, str. 693–705 (2007)
- 14) Fischle W., Tseng B.S., Dormann H.L., Ueberheide B.M., Garcia B.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Funabiki H., Allis C.D., *Regulation of HP 1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation*. Nature , 438, str. 1116–1122 (2005)
- 15) Clements A., Poux A.N., Lo W.S., Pillus L., Berger S.L., Marmorstein R., *Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase*. Mol Cell ,12, str. 461–473 (2003)
- 16) Dover J., Schneider J., Tawiah-Boateng M.A., Wood A., Dean K., Johnston M., Shilatifard A., *Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6*, J Biol Chem, 17, str. 28368-28371 (2002)
- 17) Briggs S.D., Xiao T., Sun Z.W., Caldwell J.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Allis C.D., Strahl B.D., *Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin*, Nature, 418, str. 498
- 18) Shilatifard A., *Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression*, Annu Rev Biochem, 75, str. 243-269 (2006)
- 19) Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*, Nature, 410, str. 116-120 (2001)
- 20) Baylin S.B., Herman J.G., *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*, Trends Genet, 16, str. 168-174 (2000)
- 21) Conaway R.C., Brower Ch.S., Conaway J.W., *Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation*, Science, 296, str. 1254-1258 (2002)

- 22) Weake V.M., Workman J.L., *Histone ubiquitination: Triggering gene activity*, Mol Cell, 29, str. 653-663 (2008)
- 23) Nathan D., Sterner D.E., Berger S.L., *Histone modifications: Now summoning sumoylation*, P Natl Acad Sci USA, 100, str. 13118-13120 (2003)
- 24) Mukhopadhyay D., Dasso M., *Modification in reverse: the SUMO proteases*, Trends Biochem Sci, 32, 286-295 (2007)
- 25) Shio Y., Eisenman R.N., *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*, P Natl Acad Sci USA, 100, str. 13225-13230 (2003)
- 26) Lyst M.J., Stancheva I., *A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation*, Biochem Soc T, 35, 1389-1392 (2007)
- 27) Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O., *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: Where are we today and where are we going?*, Microbiol Mol Biol R, 70, str. 789-829 (2006)
- 28) Bohm L., Schneeweiss F.A., Sharan R.N., Feinendegen L.E., *Influence of histone acetylation on the modification of cytoplasmic and nuclear proteins by ADP-ribosylation in response to free radicals*, Biochim Biophys Acta, 1334, str. 149-154 (1997)
- 29) Messner S., Altmeyer M., Zhao H., Pozivil A., Roschitzki B., Gehrig P., Rutishauser D., Huang D., Caflisch A., Hottiger M.O., *PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails*, Nucleic Acids Res, doi:10.1093/nar/gkq463, str. 1-13 (2010)
- 30) Cerutti H., Casas-Mollano J.A., *Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects?*, Epigenetics, 4, str. 71-75 (2009)
- 31) Pérez-Cadahía B., Drobic B., Davie J.R., *H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase*, Biochem Cell Biol, 87, str. 695-709 (2009)

- 32) Metzger E., Yin N., Wissmann M., Kunowska N., Fischer K., Friedrichs N., Patnaik D., Higgins J.M., Potier N., Scheidtmann K.H., Buettner R., Schüle R., *Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation*, Nat Cell Biol, 10, str. 53–60 (2008)
  
- 33) Ait-Si-Ali S., Ramirez S., Barre F.-X., Dkhissi F., Magnaghi-Jaulin L., Girault J. A., Robin P., Knibiehler M., Pritchard L. L., Ducommun B., Trouche D., Harel-Bellan A., *Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A*, Nature, 386, str. 184-186 (1998)
  
- 34) Nelson C.J., Santos-Rosa H., Kouzarides T., *Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression*, Cell, 126, str. 905–916 (2006)
  
- 35) Cuthbert G.L., Daujat S., Snowden A.W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M., Schneider R., Gregory P.D., Tempst P., Bannister A.J., Kouzarides T., *Histone deimination antagonizes arginine methylation*. Cell, 118, 545–553 (2004)
  
- 36) Fukuda H., Sano N., Muto S., Horikoshi M., *Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression*, Brief Funct Genomic Proteomic, 5, str. 190-208 (2006)
  
- 37) Chen Ch-Ch., Carson J.J., Feser J., Tamburini B., Zabaronick S., Linger J., Tyler J.K., *Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair*, Cell, 134, str. 231-243 (2008)
  
- 38) Sterner D.E., Berger S.L., *Acetylation of histones and transcription-related factors*, Microbiol Mol Biol Rev, 64, str. 435-459 (2000)
  
- 39) Marmorstein R., *Structure and function of histone acetyltransferases*, Cell Mol Life Sci, 58, str. 693-703 (2001)
  
- 40) Borrow J., Jr. Stanton V.P., Andresen J.M., Becher R., Behm F.G., Chaganti R.S., Civin C.I., Distech C., Dube I., Frischauf A.M., Horsman D., Mitelman F., Volinia S., Watmore A.E., Housman D.E., *The translocation(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein*, Nat Genet, 14, str. 33–41 (1996)

- 41) Carapeti M., Aguiar R.C, Goldman J.M., Cross N.C., *A novel fusion between MOZ and thenuclea rrecepto rcoactivator TIF2 in acute myeloid leukemia*, Blood, 91, str. 3127–3133 (1998)
- 43) Iyer N.G., Ozdag H., Caldas C., *p300/CBP and cancer*, Oncogene, 23, str. 4225-4231 (2004)
- 42) Giordano A., Avantaggiati M.L., *p300 and CBP: partners for life and death*, J Cell Physiol, 181, str. 218–230 (1998)
- 44) Gallinari P., Di Marco S., Jones P., Pallaoro M., Steinkühler Ch., *HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics*, Cell Res, 17, str. 195-211 (2007)
- 45) Marks P.A., Xu W.-S., *Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy*, J Cell Biochem, 107, str. 600-608 (2009)
- 46) de Ruijter A.J.M., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B.P., *Histonedecetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*, Biochem J, 370, str. 737-749 (2003)
- 47) Glozak M.A., Seto E., *Histone deacetylases and cancer*, Oncogene, 26, str. 5420–5432 (2007)
- 48) Martínez-Iglesias O., Ruiz-Llorente L., Sánchez-Martínez R., García L., Zambrano A., Aranda A., *Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer*, Clin Transl Oncol, 10, str. 395-398 (2008)
- 49) Ma X., Ezzeldin H.H., Diasio R.B., *Histone deacetylase inhibitors current status and overview of recent clinical trials*, Drugs, 69, str. 1911-1934 (2009)
- 50) Tan J., Cang S., Ma Y., Petrillo R.L., Liu D., *Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents*, Journal Of Hematology & Oncology, 3, str. 1-13 (2010)

- 51) Donepudi S., Mattison R.J., Kihlslinger J.E., Godleyb L.A., *Modulators of DNA methylation and histone acetylation*, update on Cancer therapeutics, 2, str. 157-169 (2007)
- 52) Nau H., Hauck R.S., Ehlers K., *Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms*, Pharmacol Toxicol, 69, str. 310-321 (2009)
- 53) Blaheta R.A., Jr.Cinatl J., *Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug*, Med Res Rev, 22, str. 492-511 (2002)
- 54) Kuendgen A., Knipp S., Fox F., Strupp C., Hildebrandt B., Steidl C., Germing U., Haas R., Gattermann N., *Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with alltrans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Ann Hematol, 84, str. 61-66 (2005)
- 55) Atmaca A., Al-Batran S.-E., Maurer A., Neumann A., Heinzl T., Hentsch B., Schwarz, S. Hövelmann S. E., Göttlicher M., Knuth A., Jäger E., *Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial*, Brit J Cancer, 97, str. 177–182 (2007)
- 56) Guillemin K., Krasnow M.A., *Hypoxic Response: Huffing and HIFfing*, Cell, 89, str. 9-12 (1997)
- 57) Harris A.L., *Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth*, Nature Rev Cancer, 2, str. 38-47, (2002)
- 58) Beasley N. J. P., Leek R., Alam M., Turley H., Cox G. J., Gatter K., Millard P., Fuggle S. Harris A. L., *Hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in head and neck cancer*, Cancer Res, 62, str. 2493-2497 (2002)
- 59) Semenza G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*, 3, Nature Rev, str. 721-732 (2003)

- 60) Mathers C., Boerma T., Fat D.M., *The global burden of disease: update 2004*, vydáno Světovou zdravotnickou organizací (WHO) v roce 2008, dostupné na adrese: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf)
- 61) Vícha A., Eckschlager T., *Molekulární biologie neuroblastomu*, Klinická onkologie, 18, str. (159-165)
- 62) Masopust J., Koutecký J., *Pacient s neuroblastomem* (rozbor kazuistiky s klinicko-biochemickým komentářem), <http://web.telecom.cz/dotdiag/dokument/patobio/neurobla.pdf>
- 63) Brodeur G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*, Nature Rev Cancer, 3, str. 203-216 (2003)
- 64) Bown N., *Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects*, J Clin Pathol, 54, str. 897- 910 (2001)
- 65) J. Cinatl Jr., J. Cinatl, P.H. Driever, R. Kotchetkov, P. Pouckova, B. Kornhuber, D. Schwabe, *Sodium Valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells*, Anti-cancer drugs, 8, str. 958-963 (1997)
- 66) J. Cinatl Jr., J. Cinatl, M. Scholz, P.H. Driever, D. Henrich, H. Kabickova, J.-U. Vogel, H. Doerr, B. Kornhuber, *Antitumour activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cell lines*, Anti-cancer drugs, 7, str. 766-773 (1996)
- 67) Ross R.A., Biedler J.L., Spengler B.A., *A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors*, Cancer Lett, 197, str. 1-5 (2003)
- 68) Göttlicher M., Minucci S., Zhu P., Krämer O.H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J.P., Lo Coco F., Nervi C., Pelicci P.G., Heinzl T., *Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells*, EMBO J, 20, str. 6969-6978 (2001)
- 69) Hřebočková J., Poljaková J., Eckschlager T., Hraběta J., Procházka P., Smutný S., Stiborová M., *Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 and 3A4 expression in these cells*, Interdisc Toxicol, 2, str. 205-210 (2009)

- 70) Kim M.S., Kwon H.J., Lee Y.M., Baek J.H., Jang J.E., Lee S.W., Moon E.J., Kim H.S., Lee S.K., Chung H.Y., Kim C.W., Kim K.W., *Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes*, Natur Med, 7, str. 437-443 (2001)
- 71) Li Q., Costa M., *c-Myc mediates a hypoxia-induced decrease in acetylated histone H4*, Biochimie, 91, str. 1307-1310 (2009)
- 72) Cheng Y.C., Lin H., Huang M.J., Chow J.M., Lin S., Liu H.E., *Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia*, Leuk Res, 31, str. 1403-1411 (2007)
- 73) Schnitzer S.E., Schmid T., Zhou J., Brüne B., *Hypoxia and HIF-1 $\alpha$  protect A549 cells from drug-induced apoptosis*, Cell Death Differ, 13, str. 16-11-1613
- 74) Phiel Ch. J., Zhang F., Huang E.Y., Guenther M.G., Lazar M.A., Klein P.S., *Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen*, J Biol Chem, 27, str. 36734–36741 (2001)
- 75) Condorelli F., Gnemmi I., Vallario A., Genazzani A.A., Canonico P.L. *Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells*, Brit J Pharmacol, 153, str. 657–668 (2008)
- 76) Kim S.H., Jeong J.W., Park J.A., Lee J.W., Seo J.H., Jung B.K., Bae M.K., Kim K.W., *Regulation of the HIF-1 $\alpha$  stability by histone deacetylases*, Oncol Rep, 17, str. 647-651 (2007)

**Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.**

<b>Jméno a příjmení s adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>
---------------------------------------	-----------------	------------------------	-----------------







